Ribonucleotidreduktase in synchronisierten, 5-Fluordesoxyuridin-stimulierten Zellen der Grünalge Scenedesmus obliquus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

WOLFGANG FELLER
aus Mittelbuchen

Marburg/Lahn 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0047

Ribonucleotidreduktase in synchronisierten, 5-Fluordesoxyuridin-stimulierten Zellen der Grünalge Scenedesmus obliquus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

WOLFGANG FELLER

aus Mittelbuchen

Marburg/Lahn 1979

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als Dissertation

angenommen am:	26. 4. 1979
Tag der mündlichen Prüfung:	9. 5. 1979
Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Follmann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Kindl

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Abkürzungen		
1.	Einleitung	1
1.1	Die Funktion der Ribonucleotidreduktase	1
1.2	Bekannte Enzymsysteme	4
1.3	Objekt und Zielsetzung dieser Arbeit	8
2.	Materialien und Methoden	12
2.1	Reagenzien, Geräte und allgemeine Verfahren	12
2.2	Pflanzenmaterial: Objekt und Zuchtbedingungen	12
2.2.1	Synchronisation von Scenedesmus obliquus	14
2.2.2	Charakterisierung der Algenkulturen	14
2.3	Bestimmung der Ribonucleotidreduktaseaktivität	15
2.3.1	Testsystem und enzymatischer Abbau zum Nucleosid	15
2.3.2	Substrat-Produkttrennung durch Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie	17
2.3.3	Radioaktivitätsmessung	19
2.3.4	Dünnschichtchromatographische Auswertung	20
2.4	Zellaufschlußverfahren	21
2.5	Reinigung der Ribonucleotidreduktase aus Scenedesmus	22
2.5.1	Fraktionierte Fällungen	22
2.5.2	Affinitätschromatographie	22
2.5.3	Reinigung der Untereinheit U1	23
2.5.4	Reinigung der Untereinheit U2	23
2.6	DNA-Bestimmung	25
2.7	Bestimmung der DNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität	26
2.8	Bestimmung der Desoxyribonucleosidtriphosphat-Pools	28
2.9	Dünnschichtchromatographische Trennungen von Nucleosiden und Nucleotiden	30
2.10	Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	32
2.11	Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation in Saccharosegradienten	34

3.	Ergebnisse	36
3.1	Nachweis der Ribonucleotidreduktase	36
3.1.1	Verlauf der Enzymaktivität im Zellzyklus	36
3.1.2	Variation der Testbedingungen im Rohextrakt	38
3.1.2.1	Einfluß von pH-Wert und Ionenstärke	38
3.1.2.2	Einfluß hoher Salzkonzentration und Detergenzien	41
3.1.2.3	Versuche zur Stabilisierung der Enzymaktivität	45
3.1.3	Stimulierung der Ribonucleotidreduktase in vivo	46
3.2	Optimierung analytischer Methoden zur Trennung von Nucleosiden und Nucleotiden	51
3.2.1	Ribonucleotidreduktaseaktivität: Test und Auswertung	51
3.2.2	Trennung von Nucleotiden und Nucleosiden auf PEI-Cellulose	53
3.2.3	Enzymatischer Abbau zum Nucleosid	56
3.2.4	Trennung der Nucleoside auf Dowex 1x8-Borat	57
3.2.5	Trennung der Nucleoside durch Mitteldruck-chromatographie	59
3.3	Reinigung der Ribonucleotidreduktase	67
3.3.1	Fällungsschritte	68
3.3.1.1	Fällung mit Ammoniumsulfat	68
3.3.1.2	Reinigung mit Polyethylenimin	71
3.3.2	Versuche zur Enzymreinigung mit klassischen Methoden	76
3.3.3	Affinitätschromatographische Trennungen	79
3.3.3.1	An 2',5'-ADP-Sepharose	79
3.3.3.2	Vergleich mit anderen Affinitätsmaterialien	83
3.3.4	Separate Reinigung beider Untereinheiten	88
3.3.4.1	Chromatographische Reinigung von U2	88
3.3.4.2	Reinigung von U1 an DEAE-Cellulose	94
3.3.5	Kombination der Reinigungsschritte	96
3.4	Eigenschaften der Ribonucleotidreduktase	99
3.4.1	Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit der Enzymreaktion	99
3.4.2	Substratspezifität	101
3.4.3	Einfluß von Metallionen	104
3.4.4	Thioredoxine als Reduktionsmittel	109
3.4.5	Kombinationsexperiment mit RRase aus E. coli	111

3.4.6	Kombination homologer Untereinheiten	112
3.4.7	Charakterisierung von U1 und U2	114
3.4.7.1	Molekulargewichtsbestimmung und Sedimentationsgeschwindigkeit	114
3.4.7.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	117
3.5	DNA-Polymerase-Aktivität in gereinigter RRase-Untereinheit U2	119
3.6	Beeinflussung der Enzymaktivität in vivo	121
3.7	Bestimmung der Desoxyribonucleosidtriphosphatpools	126
4.	Diskussion	130
4.1	Analytik der RRase-Bestimmung	130
4.2	Reinigung von Scenedesmus-RRase	131
4.3	Enzymeigenschaften	136
4.3.1	Substratspezifität	136
4.3.2	Untereinheitenstruktur	137
4.3.3	Einfluß von Metallionen	141
4.3.4	Thioredoxin-Abhängigkeit	144
4.3.5	Allosterisches Verhalten	145
4.4	Assoziation von RRasen mit anderen Enzymen der Nucleinsäuresynthese	146
4.5	Intrazelluläre Desoxyribonucleotid-Pools	148
4.6	Einfluß von 5-Fluordesoxyuridin und anderen Substanzen im Zellzyklus	152
5.	Zusammenfassung	157
Literaturverzeichnis		160

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ara-C	Arabinocytidin
BIS	N,N'-Methylenbisacrylamid
Blue-Sepharose	Cibacron Blue F3G-A an Sepharose gebunden
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie = $2{,}22 \cdot 10^{12}$ dpm
CM-Cellulose	Carboxymethyl-Cellulose
CoB_{12}	Coenzym B_{12}
cpm	Zählimpulse pro Minute
cps	Zählimpulse pro Sekunde
Cyt c	Cytochrom c
DABA	3,5-Diaminobenzoesäure
DEAE-Cellulose	Diethylaminoethyl-Cellulose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAse	Desoxyribonuclease
dpm	(radioaktive) Zerfälle pro Minute
DTT	1,4-Dithiothreit
E_{280}	Extinktion bei 280 nm
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESKV	Extern-Standard-Kanal-Verhältnis
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-2'-Hydroxyethylpiperazin-2-ethan-sulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HU	N-Hydroxyharnstoff
LDH	Lactatdehydrogenase
LDW	Licht-Dunkel-Wechsel
m	milli (10^{-3})
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
n	nano (10^{-9})
p	pico (10^{-12})
pcv	packed cell volume
PEI	Polyethylenimin

PEI-Cellulose	Polyethylenimin-Cellulose
POL	DNA-Polymerase
POPOP	1,4-Di-2(5-phenyloxyzolylbenzol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
psi	Druckeinheit (= 6,89 · 10^{-2} bar)
RNA	Ribonucleinsäure
RRase	Ribonucleotidreduktase
S	Sedimentationskonstante
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Phase	DNA-Synthesephase während des Zellzyklus
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	"Unit", Enzymeinheit
µ	mikro, 10^{-6}
U1, U2	Untereinheit 1 und 2 der Scenedesmus-Ribonucleotidreduktase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV/VIS	Ultraviolettes und sichtbares Licht
ZZ	Zellzahl

Nucleoside und Nucleobasen

Ade, Ado, dAdo	Adenin, Adenosin, Desoxyadenosin
Cyt, Cyd, dCyd	Cytosin, Cytidin, Desoxycytidin
5-FUra, 5-FdUrd	5-Fluoruracil, 5-Fluordesoxyuridin
Gua, Guo, dGuo	Guanin, Guanosin, Desoxyguanosin
Xan, Ino, dIno	Xanthosin, Inosin, Desoxyinosin
Ura, Urd, dUrd	Uracil, Uridin, Desoxyuridin

Nucleotide

	5'-Mono, -Di, -Triphosphat von
AMP, ADP, ATP	Adenosin
CMP, CDP, CTP	Cytidin
dAMP, dADP, dATP	Desoxyadenosin
dCMP, dCDP, dCTP	Desoxycytidin
dGMP, dGDP, dGTP	Desoxyguanosin
dNMP, dNDP, dNTP	Desoxyribonucleosid

dTMP, dTDP, dTTP	Thymidin
dUMP, dUDP, dUTP	Desoxyuridin
GMP, GDP, GTP	Guanosin
NMP, NDP, NTP	Ribonucleosid
UMP, UDP, UTP	Uridin

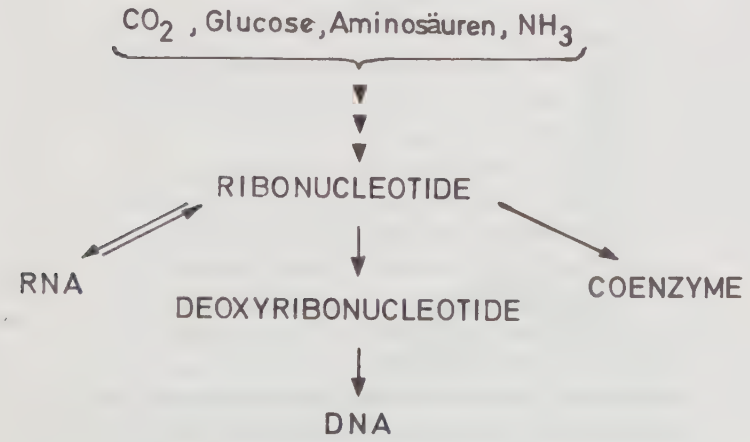
2',5'-ADP-Sepharose	Adenosin-2',5'-Phosphat über N^6 an Sepharose gebunden
5'-AMP-Sepharose	5'-AMP über N^6 an Sepharose gebunden
dATP-γP-Sepharose	dATP über Phosphat an Sepharose gebunden
5-FdUMP	5-Fluordesoxyuridinmonophosphat
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (reduziert)

1. EINLEITUNG

1.1 Die Funktion der Ribonucleotidreduktasen

Ribonucleotidreduktasen gehören zu einer zahlenmäßig kleinen, aber bedeutsamen Gruppe von Enzymen, die an der de-novo-Biosynthese von Desoxyribonucleotiden, den Komponenten der DNA, beteiligt sind [1]. Sie katalysieren die stereospezifische Reduktion aller (vier) Ribonucleosidphosphate zu den entsprechenden 2'-Desoxyribonucleotiden, indem die 2'-Hydroxylgruppe des Riboserestes durch Wasserstoff substituiert wird. Cosubstrate und Reduktionsmittel sind in fast allen bekannten Fällen Thioredoxine, kleine hitzestabile Proteine, die durch den reversiblen Wechsel zweier Cysteinreste zwischen Dithiol- und Disulfidform eine Wasserstoffübertragung ermöglichen.

Desoxyribonucleosid-5'-phosphate, die Produkte der enzymatischen Reduktion, werden unmittelbar - oder nach weiterer Phosphorylierung - als Substrate der DNA-Polymerasen verbraucht, die diese monomeren Bausteine an DNA als Matrize zur Kopie des genetischen Materials verknüpfen.



Ribonucleotidreduktasen nehmen bei der Bereitstellung der DNA-Vorläufermoleküle eine regulatorische Schlüsselposition ein, die weit über ihre katalytische Funktion hinausgeht. Einmal, indem sie dem oft verwirklichten Prinzip folgen, daß am Beginn einer Synthesekette stehende Enzyme die Geschwindigkeit der Biosynthese bestimmen und ihre Aktivitäten wiederum allosterisch durch Endprodukte beeinflußt werden [2]. Zum anderen liegen die gebildeten Desoxyribonucleotide normalerweise in der Zelle in sehr geringen Konzentrationen vor und können die DNA-Synthese als Folgereaktion nur kurze Zeit aufrechterhalten [3,4]. Der geschwindigkeitsbestimmende Faktor der DNA-Synthese in vivo wird deshalb vielfach in der Aktivität der Ribonucleotidreduktase vermutet [5,6,7]. So gelang Elford der Nachweis einer über mehrere Größenordnungen proportionalen Abhängigkeit von Enzymaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit tierischer Tumoren [7] (Abb. 1). Auch durch Befunde in anderen Organismen wie z. B. der Rattenleber und E. coli ist bekannt, daß ruhende oder schwach wachsende Zellen nur sehr geringe Enzymaktivität aufweisen.

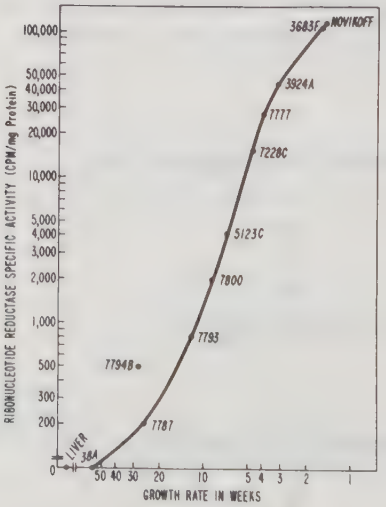


Abb. 1: Graphische Darstellung der Abhängigkeit von spezifischer Ribonucleotidreduktase-Aktivität und Tumor-Wachstumsgeschwindigkeit bei der Ratte
Aus: Elford [7]

Prinzipiell kann eine Zelle den Bedarf an Desoxyribonucleotiden zu DNA-Synthese durch enzymatisches "Recycling" schon gebildeter Nucleinsäurebruchstücke decken. Diesem "salvage pathway" kommt jedoch - besonders bei auxotroph lebenden Organismen - nur geringe Bedeutung zu [1]. Im allgemeinen wird ein kompletter de novo-Syntheseweg beschritten, dessen Enzyme in Eukaryonten oft drastische Aktivitätsänderungen kurz vor oder während der S-Phase des Zellzyklus aufweisen [9,10].

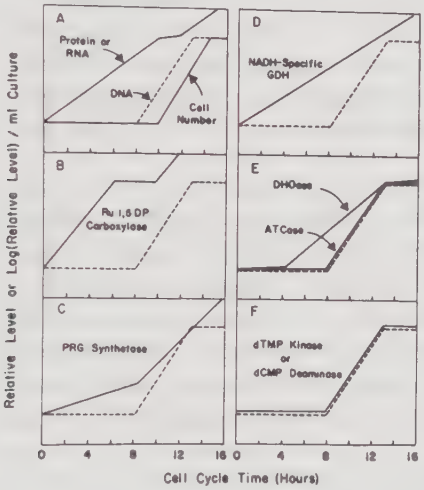


Abb. 2: Zellzyklusabhängige Änderungen des Gesamtproteins, RNA, DNA, Zellzahl und sechs Enzymen aus Chlorella pyrenoidosa (7-11-05). Aus: R. R. Schmidt [9]
(A) log (relativer Gehalt des Gesamtproteins, RNA, DNA und Zellzahl; relative Änderungen von:
(B) Ribulose-1,5-diphosphat-carboxylase;
(C) Phosphoribosylglycinamid –Synthetase;
(D) NADH-abhängige Glutamatdehydrogenase
(E) Dihydroorotase, Aspartattranscarbamylase
(F) Thymidylat-Kinase oder dCMP-Desaminase
- - - - DNA-Gehalt

Abbildung 2 zeigt die zellzyklusabhängigen Aktivitätsschwankungen einiger an der Nucleinsäuresynthese beteiligter Enzyme (C,E,F), DNA-, RNA- und Proteingehalt sowie die Zellzahl (A) in synchronisierten Chlorella-Kulturen [9]. Besonders auffallend ist die Übereinstimmung der Enzymaktivitätsprofile von DNA-Gehalt und dTMP-Kinase und dCMP-Desaminase (F), die an der Synthese des Thymidintriphosphates beteiligt sind. Man fand jedoch auch ähnliche Muster bei Enzymen, die in keinem unmittelbaren Zusammenhang mit der DNA-Synthese stehen, wie etwa bei Isocitratlyase und NADPH-spezifischer Glutamatdehydrogenase in Chlorella pyrenoidosa (7-11-05) [11,12]. Andererseits wurden auch kontinuierlich ansteigende Aktivitäten ohne drastische Änderungen während der S-Phase (ähnlich D in Abb. 2) bei DNA-Polymerase in Chlorella gemessen [13].

Sollte jedoch die Aktivität eines Enzyms der DNA-Vorläufersynthese als limitierender Faktor der DNA-Synthese in Betracht kommen, so erwartet man den gleichen zeitlichen Verlauf von Enzymaktivität und DNA-Syntheserate während des Zellzyklus. Aufgrund dieser notwendigen Voraussetzung scheiden Enzyme mit den in Abb. 2 gezeigten Kurvenformen aus; vielmehr kommen nur "Peak-Enzyme" als mögliche Kandidaten der Regulation der DNA-Synthese in Frage. Ribonucleotidreduktasen sind derartige "Peak-Enzyme" [5,14,15], die nur während der S-Phase eine induzierbare und dann wieder verschwindende Aktivität besitzen. Ihr enger Zusammenhang mit DNA-Synthese, Regulation des Zellzyklus und Zellvermehrung wird dadurch erneut belegt.

1.2 Bekannte Enzymsysteme

Die bisher untersuchten Ribonucleotidreduktasen lassen sich zwanglos in zwei verschiedene Enzymtypen einordnen, deren wesentliche Unterschiede kurz dargestellt werden sollen [1].

Enzyme des Typs I (EC 1.17.4.1), am intensivsten studiert bei Escherichia coli, wurden in Mikroorganismen, Tieren und höheren Pflanzen gefunden, wobei stets Ribonucleosiddiphosphate als Substrate dienen. Der katalytische Mechanismus ist bei Ribonucleotidreduktase aus E. coli in einigen Aspekten bekannt. Man weiß, daß Nicht-Häm-Eisen im aktiven Zentrum vor-

handen ist und Radikale an der Reaktion beteiligt sind, ferner fördern Magnesiumionen die Zusammenlagerung der beiden ungleichen Untereinheiten zum katalytisch aktiven Dimeren. Inwieweit jedoch diese Eigenschaften analog auf alle anderen Ribonukleotidreduktasen des Typs übertragbar sind, ist noch ungewiß. Bisher übliches Kriterium ist eine fehlende Abhängigkeit von zugesetztem Coenzym B_{12}, dem Charakteristikum der Enzyme des Typs II [16]. Vielfach werden die Enzymaktivitätsstimulation durch Eisensalze und die Hemmung durch Eisenkomplexbildner als Merkmal für Typ I betrachtet. Die Interpretation dieser Stimulations- und Hemmversuche bleibt aber fragwürdig, wenn Rohhomogenate oder nur schwach angereicherte Enzympräparationen eingesetzt werden.

Typ II-Ribonucleotidreduktasen (EC 1.17.4.2) benötigen zur katalytischen Aktivität als essentiellen Cofaktor 5'-Desoxyadenosylcobalamin (Coenzym B_{12}), dessen Wechselbeziehung mit dem Enzymmolekül bei dem System aus Lactobacillus leichmannii in Details aufgeklärt ist; auch hier sind Radikalzwischenstufen nachgewiesen. Enzyme der Gruppe II setzen entweder Ribonucleosidtriphosphate oder Diphosphate als Substrate um. Metallionen sind ohne Einfluß auf die Enzymaktivität [1].

Beiden Enzymtypen gemeinsam ist die im Einzelfall unterschiedliche, komplexe allosterische Modulation der Enzymaktivität durch Nucleotide, die Gegenstand zahlreicher mechanistischer Untersuchungen bildet. Aus kinetischen Daten abgeleitete Mechanismen, die eine ausgewogene Synthese aller Desoxyribonucleosidtriphosphate sicherstellen, lassen sich dabei modellmäßig für beide Gruppen konstruieren, mit Sicherheit sind die in vitro gefundenen Ergebnisse jedoch auf das Geschehen in der Zelle nicht unkritisch übertragbar [17].

Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Abhängigkeit von artspezifischen Thioredoxinen als Cosubstraten, die in in vitro-Testsystemen teilweise untereinander austauschbar sind [18]. Thioredoxine und Thioredoxinreduktasen, die die Rückreduktion des

oxidierten Thioredoxins katalysieren, zeigen im Gegensatz zu Ribonucleotidreduktasen keine drastischen Aktivitätsunterschiede während des Zellzyklus und in Abhängigkeit von der Proliferationsgeschwindigkeit [18,21,32], ihnen ist deshalb keine regulatorische Funktion bei der DNA-Synthese zuzuschreiben.

Zum Test auf Ribonucleotidreduktasen mißt man optisch den Verbrauch von NADPH, dessen Reduktionsäquivalente im gekoppelten System via Thioredoxinreduktase-Thioredoxin-Ribonucleotidreduktase auf das zu reduzierende Ribonucleotid übertragen werden. Da jedoch nur in wenigen Fällen alle (homologen) Komponenten verfügbar sind, muß man meist diese Sequenz entkoppeln und reduziertes Thioredoxin als Elektronendonator zum Test einsetzen. Verbrauchtes Thioredoxin wird dann nichtenzymatisch durch zugesetzte Dithiole zurückreduziert. Liegt auch ein geeignetes Thioredoxin nicht in gereinigter Form vor, ist es auch durch Dithiothreit als Reduktionsmittel völlig zu ersetzen. Dieses Testprinzip war bisher für alle Enzyme beider Gruppen anwendbar. Ob noch andere Reduktionsmittel in vivo existieren wie das in E. coli gefundene "Glutaredoxin", das nichtenzymatisch durch reduziertes Glutathion zurückreduziert wird, ist bisher unbekannt [19].

Ribonucleotidreduktasen gelten als lösliche Enzyme, die in der Zelle im Cytoplasma lokalisiert sind [1]. Man hat das Enzym zwar auch in Zellkernen und Rattenlebermitochondrien nachgewiesen, doch konnte die Kompartimentierung nicht an anderen Organismen belegt werden [20].

Für verschiedentlich geäußerte Vermutungen, Ribonucleotidreduktase als Teil eines Multienzym-Replikationskomplexes anzusehen, liegen bisher nur wenige experimentelle Anhaltspunkte vor. So wies Elford eine Assoziation von Ribonucleotidreduktase, DNA-Polymerase II, Thymidylat-Synthetase und Thymidylat-Kinase in einer post-mikrosomalen Membranfraktion in verschiedenen Geweben der Ratte und HeLa-Zellen nach [22,23].

Soweit bekannt, folgt die Quartärstruktur der Ribonucleotidreduktasen keinem einheitlichen Prinzip. So bestehen in Gruppe II die Enzyme aus L. leichmannii und Thermus aquaticus aus einer Peptidkette [8], während die Reduktasesysteme in E. gracilis aus vier und in Corynebacterium nephridii aus zwei jeweils identischen Untereinheiten aufgebaut sind [8]. In Gruppe I, beschrieben in E. coli, Bakteriophagen (T4) und in tierischen Geweben bestehen alle bisher teilgereinigten Ribonucleotidreduktasen aus zwei nichtidentischen Untereinheiten, die für sich alleine keine Enzymaktivität besitzen. Erst zusammen bilden beide Einheiten das katalytisch aktive Enzymmolekül. Das Bedürfnis für Magnesium- und Eisenionen innerhalb der Gruppe ist unterschiedlich.

Eine Dissoziation der gereinigten Untereinheiten in je zwei Peptidketten unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese ist bei E. coli und T4-Phagen sicher nachgewiesen und wird auch für tierische Zellen diskutiert. Die Quartärstruktur läßt sich nach augenblicklicher Erkenntnis als $\alpha_2\beta_2$ oder $\alpha\alpha'\beta_2$ angeben. Auch scheint eine Präferenz für Molekulargewichte der Polypeptidketten im Bereich von 80 000 Dalton bzw. dessen Vielfachem oder Teilen zu bestehen.

Eine systematische Einordnung der beiden Enzymtypen unter den Lebewesen ist noch nicht möglich. So stellt bei Cyanobakterien der Genus Synechococcus Beispiele beider Ribonucleotidreduktasen [25]. Es wurde deshalb sogar vorgeschlagen, neben anderen biochemischen Daten wie der DNA-Basenzusammensetzung auch Ribonucleotidreduktase, die "eine signifikante evolutionäre Divergenz" der Zellen widerspiegelt, als taxonomisches Merkmal anzusehen. B_{12}-abhängige Reduktasen scheinen allerdings nur in Bakterien und wenigen niederen Eukaryonten vorzukommen. Bei Pflanzen fehlen bisher genauere Kenntnisse über die Ribonucleotidreduktion. Erst vor wenigen Jahren sind pflanzliche Ribonucleotidreduktasen überhaupt nachgewiesen worden [26,27,28], doch genügen die wenigen Einblicke nicht zu einer allgemeinen Beurteilung der DNA-Vorläufersynthese im Pflanzenreich. An ihrer generellen Anwesenheit besteht kein Zweifel, gibt es doch indirekte Hinweise durch Markierungs-

experimente und Inhibitorversuche [29,30]. Lediglich in wenigen Untersuchungsobjekten wie keimenden Samen des Weizens [26], der Soja- und Ackerbohne konnten mit Hilfe des empfindlichen radiochemischen Assays geringe Reduktaseaktivitäten nachgewiesen werden [28,31]. Eine Motivation zur Charakterisierung weiterer Reduktasen war daher, diese Lücke an einem ausgewählten Organismus zu schließen.

Die auffällige Diskrepanz zwischen der Bedeutung von Ribonukleotidreduktasen und den bisher nur spärlichen experimentellen Daten erklärt sich durch die Schwierigkeiten, das Enzym in Rohhomogenaten nachzuweisen, ganz abgesehen von der Möglichkeit der Reinigung. Sie liegen in der Tatsache begründet, daß es sich um Enzyme geringer Stabilität handelt, die nur in geringen Mengen in der Zelle vorkommen. Zudem wird der Enzymnachweis durch zahlreiche Konkurrenz- und Folgereaktionen der Substrate, Produkte und allosterischen Effektoren stark gestört, die oft ein Vielfaches der zu messenden Aktivität darstellen [33]. Auch konnten aus verschiedenen Organismen wie dem Pilz Achlya , Ehrlich-Ascites-Zellen, Hefe und Weizen spezifische, hitzestabile Inhibitoren isoliert werden [34,35,36,37], die verständlicherweise Reduktionsnachweise erschweren.

1.3 Objekt und Zielsetzung dieser Arbeit

Man kann voraussagen, daß Ribonucleotidreduktase in Pflanzen mit Aussicht auf Erfolg nachweisbar und einer Reinigung zugänglich sein sollte, wenn ein Organismus rasch wächst, möglichst vollständig zu synchronisieren ist und es eventuell gestattet, allein durch Manipulation äußerer Wachstumsparameter Ribonucleotidreduktase in der S-Phase anzureichern.

Diese Voraussetzungen sind in einzelligen Grünalgen wie Scenedesmus, Chlorella oder Chlamydomonas in idealer Weise erfüllt. Sie stellen ein Bindeglied zwischen höheren Pflanzen und prokaryontischen, phototrophen Organismen dar. Auch eine Abgrenzung gegenüber dem Flagellaten Euglena gracilis, bei dem Typ II-Reduktase gefunden wurde, verspricht weitere

Einsicht in phylogenetische Verwandschaften.

Chlorella, von O. Warburg in die Photosyntheseforschung eingeführt, konnte als erste Grünalge in Massenkultur synchronisiert werden [38]. Die Synchronisation, das - mit einer gewissen Unschärfe - gleichzeitige Ablaufen aller Entwicklungszustände aller Individuen einer Zellpopulation, wird durch periodische Hell-Dunkelphasen erzielt. Der Helldunkelwechsel erweist sich als besonders günstig, weil er gegenüber anderen Synchronisationsmaßnahmen wie Temperaturwechsel oder dem Einsatz von Hemmstoffen nicht massiv in den Zellstoffwechsel eingreift und einen hohen, von anderen Organismen nicht erreichten Synchronisationsgrad bewirkt.

Mittlerweile wurden viele Arten verschiedener phototropher Algen durch Helldunkelwechsel synchronisiert, wobei lediglich die Bedingungen wie etwa die Dauer der Licht- und Dunkelphasen artabhängig zu optimieren waren [39,40].

Wir wählten die Alge Scenedesmus obliquus, Stamm D3, als Studienobjekt, deren Wachstumsverhalten unter homokontinuierlichen und synchronen Kulturbedingungen gut charakterisiert ist [41,42]. Die Gattung Scenedesmus, deren Spezies in Süßwasser und feuchtem Boden gefunden werden, gehört zur Ordnung der Chlorococcales, die sich nicht durch einfache Zweiteilung, sondern Zerklüftung des Cytoplasmas mit Bildung von Autosporen und fester Zellwand vegetativ vermehren. Dazu wird die Zellwand der Zellen abgesprengt und acht (oder mehr) Autosporen, die zunächst noch als Coenobien zusammenhängen, werden frei. Durch die starke Bewegung des Mediums beim Belüften zerfallen sie jedoch rasch. Bei Scenedesmus mit mehr als 100 Spezies ist eine Unterscheidung alleine aufgrund morphologischer Befunde nicht mehr möglich, sondern erst die Einbeziehung biochemischer Eigenschaften wie der Induktion des Hydrogenasesystems (Photoreduktion) läßt eine systematische Klassifizierung zu.

Eigene Vorarbeiten zeigten ein starkes Anwachsen der Reduktaseaktivität nur während der S-Phase des Zellzyklus dieser Alge sowie die Abhängigkeit von Dithiolen wie Dithiothreit als essentielle Reduktionsmittel im in vitro Test.[15] Eine Stimulation des Umsatzes durch 5'-Desoxyadenosylcobalamin konnte dagegen nicht gefunden werden. Die für pflanzliche Zellen relativ hohe Enzymaktivität im Rohextrakt bot eine günstige Ausgangssituation für ein genaueres, weitergehendes Studium des Enzyms. Eine Anreicherung des Enzyms sollte die Analyse molekularer und kinetischer Daten und Vergleiche mit denen anderer Reduktasen ermöglichen. Zudem sind die synchronisierten Zellen ein geeignetes System, zellzyklusabhängig die Konzentration der Desoxyribonucleosidtriphosphate als unmittelbare Reduktionsprodukte in vivo zu verfolgen und mit dem Aktivitätsprofil des Enzyms sowie der DNA-Bildung zu vergleichen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Induktion von Ribonucleotidreduktase. So fand Vitols in synchron wachsender Hefe (Saccharomyces cerevisiae) eine starke Erhöhung der Enzymaktivität bei Zugabe von 5-Fluoruracil im Kulturmedium über die S-Phase hinaus [14]. Dieser Effekt, dessen molekulare Grundlagen ungeklärt sind, sollte ebenfalls in Scenedesmus überprüft werden.

Neben den Problemen, die in der Proteinnatur und Spezifität des Enzyms liegen, treten bei Ribonucleotidreduktasen häufig experimentelle Schwierigkeiten mit dem zwar äußerst empfindlichen und spezifischen aber langwierigen und umständlichen Enzymtest auf. Ribonucleotidreduktaseaktivität wird bestimmt, indem man die Testmischung mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert und einheitlich zum Nucleosid oder Nucleosidmonophosphat abbaut [2]. Die sich daran anschließende Substrat-Produkttrennung ermöglicht die Bestimmung deren Mengenverhältnisses durch Radioaktivitätsmessung. Bisher sind zahlreiche Methoden zur chromatographischen Trennung beschrieben worden, die sich stark im zeitlichen Aufwand, ihrer Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit unterscheiden. Eine Trenn-

methode, die Vorteile aller bisher beschriebenen Systeme in sich vereint, schnell und automatisierbar ist, kann als Ergebnis meiner eigenen Arbeit vorgestellt werden.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Reagenzien, Geräte; Allgemeine Verfahren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren "reinst", "für biochemische Zwecke" oder "p. A." und stammten, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Serva, Boehringer, Merck und Riedel de Haen. Die Hersteller von Spezialreagenzien, Enzymen, radioaktiv markierten Substanzen, Dünnschichtplatten sowie Säulenmaterialien werden gesondert angegeben. Zentrifugationen wurden in gekühlten Sorvall- und Beckman-Zentrifugen durchgeführt. Für photometrische Bestimmungen stand ein Cary 15 sowie ein Zeiss PMQ3 Spektralphotometer zur Verfügung. Säulenchromatographische Proteintrennungen erfolgten mit Hilfe von LKB-Fraktionssammlern und -Zubehör und wurden bei 0-4°C durchgeführt. Die pH-Werte der verwendeten Puffer beziehen sich auf Zimmertemperatur. Proteingehalte wurden nach Lowry et al. mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard sowie durch Extinktionsmessung bei 280/260 nm und Berechnung nach der Methode von Warburg und Christian bestimmt [43]. Die Proteinbestimmung nach Bradford mit BSA als Eichsubstanz fand bei Proben sehr geringen Proteingehaltes Anwendung [45]. Da viele der verwendeten Puffer Dithiothreit (DTT) oder 2-Mercaptoethanol enthielten, mußte vor der Proteinbestimmung nach Lowry eine Präzipitation mit Trichloressigsäure (10 %) durchgeführt werden.

2.2 Pflanzenmaterial: Objekt und Zuchtbedingungen

Die einzellige Grünalge Scenedesmus obliquus, Stamm D3 (Gaffron 1939), wird in axenischen Kulturen unter autotrophen Bedingungen[41] in einem sterilen, definierten anorganischen Flüssigkeitsmedium gezüchtet. Die Zusammensetzung der Nährlösung - zuerst von Kessler et al. publiziert und von Bishop und Senger modifiziert - hatte folgende Zusammensetzung [44,81]:

Zusammensetzung des Mediums

Stammlösung I:	Konzentration im Nährmedium
$NaCl$	$8.0 \cdot 10^{-3}$ M
KNO_3	$8.0 \cdot 10^{-3}$ M
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	$1.0 \cdot 10^{-3}$ M
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	$1.0 \cdot 10^{-4}$ M
Stammlösung II:	
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	$1.0 \cdot 10^{-3}$ M
$NaH_2PO_4 \cdot 1\ H_2O$	$3.0 \cdot 10^{-3}$ M
Na-Citrat $\cdot 2\ H_2O$	$5.5 \cdot 10^{-4}$ M
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 7\ H_2O$	$7.5 \cdot 10^{-6}$ M
Spurenelemente A5:	
H_3BO_3	$4.5 \cdot 10^{-5}$ M
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	$8.0 \cdot 10^{-6}$ M
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	$7.0 \cdot 10^{-7}$ M
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	$1.0 \cdot 10^{-7}$ M
$CnSO_4 \cdot 5\ H_2O$	$3.0 \cdot 10^{-7}$ M

Zur Herstellung des Nährmediums werden je 10 ml der beiden Stammlösungen, sowie 1 ml der Spurenelementlösung A5 auf einen Liter verdünnt, autoklaviert und in sterilen Impfkästen jeweils 250 ml in zylindrische Kulturröhren überführt. Die Kulturröhren, die durch ein am Boden angesetztes Glasrohr mit CO_2-angereicherter Luft (3 %) belüftet werden, stehen in einem auf 28°C thermostatisierten Lichtthermostaten. Die Belüftung mit ca. 5 l/h stellt sowohl die Versorgung der Zellen mit Kohlendioxid und Sauerstoff als auch die ständige Durchmischung der Algensuspension sicher. Als Lichtquelle dient eine Leuchtstoffröhrenkombination [44], mit der an der Oberfläche der Kulturgefäße eine Beleuchtungsstärke von 20 000 Lux erreicht wird.

2.2.1 Synchronisation von Scenedesmus obliquus

Die Synchronisation von Scenedesmus wird durch täglichen, zyklischen Wechsel von 14 Stunden Licht- und 10 Stunden Dunkelphase (14:$\overline{10}$) erreicht. Jeweils zu Beginn der Lichtzeit (0. Stunde) erfolgt die automatische, photometrisch kontrollierte Verdünnung der Algenkultur [76] auf eine konstante Zellzahl von 3.9×10^6 Zellen/ml Algensuspension. Die Zellzahl - entsprechend 250 in der Thoma Zellkammer - ist so gewählt, daß keiner der Parameter wie Zusammensetzung des Nährmediums, Belüftung und Lichtgenuß der Einzelzelle für das Wachstum der Algenpopulation limitierend wird und während der Kultivierung stets exponentielle Wachstumsbedingungen gewährleistet bleiben. Die einmal eingestellte Zellzahl wird gelegentlich überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Bevor Proben synchroner Algen entommen werden konnten, war das von Schrägagar überimpfte Inokulum etwa eine Woche im periodischen Lichtdunkelwechsel (LDW) gewachsen und die Kultur entsprach den für synchrones Wachstum geforderten strengen Kriterien [39]. Um genügend Zellmaterial für weitere Untersuchungen zu erhalten, wurde der automatisch kontrollierten Stammkultur jeweils vor Lichtbeginn Algensuspension entnommen und in Kulturröhren mit frischem Nährmedium zur gewünschten Zelldichte überimpft. In dem so eingestellten Zellzyklus von 24 Stunden erfolgt die DNA-Synthese (S-Phase) während der 8.-14. Stunde des Zellzyklus; zur 14.-17. Stunde ab Lichtbeginn erfolgt die konzertierte Freisetzung der Autosporen.

2.2.2 Charakterisierung der Algenkulturen

Die Bestimmung des Volumens dichtest gepackter Zellen (pcv = packed cell volume) durch standardisierte Zentrifugation erfolgte in Hämatokritröhrchen. Hierzu wird ein bestimmtes Volumen (2-5 ml) gut durchmischter Algensuspension in einer Tischzentrifuge 5 Min. bei 1500 g zentrifugiert. Einer relativen Zellzahl von 250 entspricht etwa 1.75 µl/5 ml Algen-

kultur der O. h des Zellzyklus.

Die relative Zellzahl (ZZ) der Algenkultur wird durch Auszählen mit einer Zählkammer (Thoma, neu) bestimmt. Multiplikation mit dem Faktor 1.56×10^4 ergibt die absolute Zellzahl/ml Zellsuspension.

Die Zugabe von Inhibitoren erfolgt über Sterilfiltration mit Hilfe von Membranfiltern (Millipore "Millex" 0,22 µm).2-5 ml der in Wasser gelösten Substanzen werden hierzu mit einer Kunststoffspritze durch die sterile Membran zur Algenkultur getropft.

Die Zellen werden zur Ernte abzentrifugiert (5 Min., 1000g), mit kaltem Aufschlußpuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit Puffer können die Zellen entweder sofort aufgearbeitet oder bei -80°C eingefroren und ohne Verlust der Enzymaktivität gelagert werden.

2.3 Bestimmung der Ribonucleotidreduktase-Aktivität

2.3.1 Testsystem und enzymatischer Abbau zum Nucleosid

Zur Bestimmung der Ribonucleotidreduktaseaktivität waren während dieser Arbeit Umstellungen des Testsystems nötig. Mit zunehmender Reinigung der Ribonucleotidreduktase verändert sich das Muster von Konkurrenz- und Folgereaktionen, und das Bedürfnis für Cofaktoren wie Magnesium oder Eisenionen konnte erst auf fortgeschrittener Reinigungsstufe bestimmt werden. Andere unbekannte Testparameter wie Ionenstärke, pH-Optimum, Art und Konzentration des allosterischen Effektors, mußten jeweils nach weiteren Reinigungsschritten überprüft und korrigiert werden. Ein für nahezu alle Reinigungsstufen optimales Testsystem, im Folgenden als "Standardtest" bezeichnet, wurde außer bei Untersuchungen mit Rohextrakten verwendet. Lediglich dort ersetzte ATP (3.5 mM) das im Standardtest eingesetzte dATP. Das homologe, wahrscheinlich in vivo als Reduktionsmittel wirkende Protein

Thioredoxin konnte im Testsystem stets durch Dithiothreit als Wasserstoffdonator ersetzt werden. Das Testgemisch enthält in einem Endvolumen von 300 µl:

	Konzentration Stammlösung	Zugabe (µl) zum Testgemisch	Konzentration im Testgemisch
10 µCi[5-^{3}H]CDP	-	(10 µl)*	1.4-4.2 µM
Enzym in Kaliumphosphatpuffer pH 6.6; 1 mM DTT	50 mM	200	33 mM
DTT	60 mM	25	5.66 mM
dATP	120 µM	25	10 µM
ATP**	42 mM	25	3.5 mM
H_2O oder weitere Zusätze	-	50 µl	-

* Lösungsmittel (Ethanol/H_2O) wird abgedampft, spezifische Aktivität 8-23 Ci/mmol

** Nur im Test mit Rohextrakten verwendet; die Stammlösung wird mit KOH neutralisiert.

Weitere Substanzen können anstatt Wasser in 50 µl zugesetzt werden.

Tritiummarkiertes Cytidindiphosphat wird im Reaktionsgefäß im Wasserstrahlvakuum eingeengt. Erst dann folgt die Zugabe aller weiteren Testkomponenten. Die enzymatische Reaktion wird durch Zufügen des Enzyms gestartet und bei 30°C inkubiert. Nach 60 Minuten stoppt man in siedendem Wasserbad (3 Minuten) und gibt je 0.5 µMole Cytidin, Desoxycytidin und Cytosin in 100 µl als Carrier zu. Nach dem Abzentrifugieren des denaturierten Proteins setzt man je 20 µl 0.5 M TRIS-HCl pH 8.9 sowie 4 IU alkalischer Phosphatase (Kälber-

darm, Grade I, EC 3.1.3.1 Boehringer) zu. Der enzymatische Abbau der Nucleotide zur Nucleosidstufe erfolgt während 90 Minuten bei 37°C. Nach Hitzedenaturierung im Wasserbad (3 Minuten) und Abzentrifugieren des ausgefallenen Proteins kann die Lösung über mehrere Wochen ohne meßbare Veränderung ihrer Nucleosidzusammensetzung bei 0°C aufbewahrt oder sofort zur Substrat-Produkttrennung weiterverwendet werden.

2.3.2 Substrat-Produkttrennung durch Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie

Eine optimale Trennungsmethode aller Nucleoside und Nucleobasen, die im Ribonucleotidreduktasetest entstehen, wurde 1975 von Pal und Hamilton publiziert [46]. Das Verfahren der HPLC-Chromatographie gestattet eine sehr schnelle (60 Minuten), reproduzierbare Trennung. Auch einige störende Folge- und Konkurrenzreaktionen im Ribonucleotidreduktasetest wie etwa die Spaltung der N-Glykosidischen Bindung unter Bildung der Nucleobasen oder die enzymatische Desaminierung zu Uridinderivaten sind in einem Trennungsschritt erfaßbar.

In Abwandlung der beschriebenen Methodik wurden für eine Chromatographie im Mitteldruckbereich Trennbedingungen optimiert, die es erlauben, Probenvolumina bis zu 150 µl in einer Stunde zu trennen und Probenaufgabe und Ablauf der Trennung zu automatisieren.

Trennprinzip ist die pH-abhängige Komplexbildung von Borsäure mit der cis-Glykolstruktur im Zuckerrest der Ribonucleoside, die die negative Ladung der Ribonucleoside erhöht und den an sich geringen strukturellen Unterschied zu Desoxyribonucleosiden stark vergrößert. Das Verfahren eignet sich zur Trennung von Ribo-, Arabino- und Desoxyribonucleosiden sowie deren Basen [47]. Daneben haben die Ladungsunterschiede der Basen sowie - in geringerem Maße - auch deren hydrophobes Verhalten auf den Säulenmaterialien einen Einfluß auf das Elutionsverhalten (Retentionszeit).

Die Nucleoside und Nucleobasen werden in folgender Reihenfolge von der Säule (s. u.) eluiert: Uridin, Desoxyuridin, Uracil, Cytidin, Desoxycytidin, Cytosin.

Verwendet wurde ein Aminosäureanalysator Multichrom 4255 der Firma Beckman. Der Teil des Gerätes, der bei Aminosäure-Analysen für den abgestimmten Zufluß von Ninhydrinlösung für die Farbreaktion sowie deren Messung, Registrierung und elektronischer Integration verantwortlich ist, wurde vom Pufferkreislauf abgeklemmt.

Bis zu 30 Proben von je 100 µl werden in die Probenspiralen des Probengebers eingespritzt. Automatisch gesteuert werden die Probenspiralen der Reihe nach in den Pufferstrom eingeschaltet, der vom Pufferreservoir über eine Kolbenpumpe zur thermostatisierten Säule führt. Verwendung fand eine mit Beckman Harz M 71 gepackte Säule (30 cm x 0,9 cm Ø). Zur eindeutigen Zuordnung der getrennten Nucleoside und Basen durch ihre Retentionszeiten wird der Pufferstrom aus der Säule zur Registrierung durch die Mikrodurchflußküvette (20 µl Volumen) eines Spektralphotometers mit Schreiber geleitet. Als sehr vorteilhaft erwies sich die Verwendung eines automatisch gesteuerten, diskontinuierlichen pH-Gradienten zur Elution der Nucleoside, der zur wesentlichen Verkürzung der Analyse führte und die typische, bei länger dauernden Trennungen auftretenden starke Bandenverbreiterung verhinderte.

Die getrennten Komponenten werden in einem Fraktionssammler aufgefangen. Die Parameter einer Trennung von Cytidinderivaten sind tabellarisch aufgelistet.

Trennmaterial: M 71 Beckman
Durchflußgeschwindigkeit: 60 ml/h
Druck: 19-23 bar = 275-333 psi (pound weight per square inch)
Säulentemperatur: 55°C
Dauer einer Trennung: 60 Minuten
Anzahl der Fraktionen/Analyse: 20
Volumen/Fraktion: 3.0 ml
Gradient: Puffer I 100 mM NH_4-Borat pH 7.30 von 0-16 Min.
Puffer II 100 mM NH_4-Borat pH 8.00 von 16-24 Min.
Puffer III 100 mM NH_4-Borat pH 7.30 von 40-59 Min.

Die Bestimmung der enzymatisch gebildeten Menge Desoxyribonucleosid erfolgte, indem jeder Fraktion ein gleicher Teil (200 µl) entnommen wurde. Die Retentionszeit der Nucleoside ist aufgrund des aufgezeichneten Elutionsprofils der optischen Dichte und der Radioaktivitätsverteilung bekannt. Die Retentionszeit schwankt nur innerhalb sehr enger Grenzen ($\pm$ 15 sec). Faßt man jeweils die Fraktionen zusammen, die nur ein Nucleosid enthalten und mißt deren Radioaktivität, so läßt sich aus den Radioaktivitätsverhältnissen der Einzelpeaks die prozentuale Zusammensetzung der zur Trennung aufgegebenen Probe berechnen. Bei Kenntnis von Menge und spezifischer Aktivität des zum Test eingesetzten Nucleotids bestimmt man den enzymatisch gebildeten Anteil Desoxyribonucleotids pro Zeiteinheit (pMol/h).

Zusätzlich ist die Zählausbeute der Radioaktivitätsmessung zu berücksichtigen, da sie in Abhängigkeit von dem zur Messung eingesetzten Volumen Boratpuffer schwankt.

Die beschriebene Analysenmethode setzt sowohl einen vollständigen Abbau aller Nucleotide der Testmischung zum entsprechenden Nucleosid als auch die genaue und reproduzierbare Probenentnahme aus den aufgefangenen Fraktionen nach der Trennung voraus. Alle weiteren Manipulationen der Probe, eventuelle Verluste oder die Berücksichtigung des zur Trennung eingesetzten Probenvolumens bleiben jedoch ohne Einfluß auf das Ergebnis.

2.3.3 Radioaktivitätsmessung

Radioaktivitätsmessungen (cpm) und die Berechnung der absoluten Radioaktivität (dpm) wurden in einem Berthold Betaszint BF 5000 Flüssigkeitsszintillationszähler durchgeführt. Die borathaltigen Lösungen, deren Volumen zwischen 0.6 und 1.6 ml variiert, wurden mit je 10 ml Unisolve I (Fa. Zinsser) als Szintillationscocktail versetzt und bei offenem Energiefenster des Gerätes 10 Minuten gemessen. Schwankungen der Zählausbeute, die für tritiummarkierte Proben zwischen 29-35 % liegen, werden durch eine Löschkorrekturkurve und der Methode des externen Standard-Kanal-Verhältnis-Methode (ESKV) kompensiert. Zur Eichung werden Proben mit verschiedenem Volumen an Boratlösung (100 mM; pH 7.30) und $^{3}H_2O$ als Standard gemessen und die gleichzeitig bestimmten

ESKV-Werte gegen die Zählausbeute aufgetragen. Die Kurve wird rechnerisch durch ein Polynom 3. Grades approximiert. Für unsere Zwecke reichten jedoch zwei Koeffizienten des Polynoms zur befriedigenden Löschkorrektur aus, die dann als Berechnungsgrundlage bei allen weiteren Radioaktivitätsmessungen zur Bestimmung der absoluten Aktivität (dpm) diente [48].

2.3.4 Dünnschichtchromatographische Auswertung

Ohne Verwendung des beschriebenen automatisierten Trennungsverfahrens zur Substrat-Produkttrennung des Ribonucleotidreduktase-Tests ist eine Trennung auf PEI-Cellulose-Dünnschichtplatten praktikabel.

Nach der Inkubation der Testmischung mit Ribonucleotidreduktase wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Perchlorsäure (1M) gestoppt und je 0.5 µMol CMP und dCMP als Carrier zugesetzt. Saure Hydrolyse zum Abbau der Nucleosiddi- und triphosphate zu Monophosphaten erfolgt während 10 Minuten im siedenden Wasserbad. In der Kälte wird mit 4 M KOH neutralisiert, die Probe eine weitere Stunde im Eisbad belassen und das ausgefallene $KClO_4$ abzentrifugiert. Nachdem der Überstand im Rotationsverdampfer bei ca. 40°C zur Trockene eingeengt ist, wird der Rückstand mit ca. 50 µl Wasser aufgenommen und auf die vorbehandelte PEI-Platte aufgetragen. Die Polyäthylenimincelluloseschicht der käuflichen Platten (PEI-Cellulose mit Fluoreszenzindikator (20 x 20 cm; Fa. Schleicher und Schüll) wird vor der Trennung der Nucleotide in die Chloridform überführt, indem zunächst in 10 % NaCl-Lösung und Wasser aufsteigend entwickelt und nochmals mit Wasser nachgewaschen wird. Auf die über Nacht getrockneten Platten trägt man die Proben auf und trennt die Nucleotide aufsteigend in einem borsäurehaltigen Laufmittel nach Schrecker [51] (1 M LiCl mit Borsäure gesättigt: Ethanol = 1:1). Nach einer Laufzeit von 5-7 Stunden lassen sich die Platten trocknen und die Radioaktivitätsverteilung durch Messung am Dünnschichtscanner (Berthold LB 2723) aufzeichnen. Ein eingebauter Integrator summiert die gemessenen Impulse der getrennten Peaks auf, aus deren relativer Größe sich die Zusammensetzung der Probe be-

rechnen läßt. Der nun bekannte prozentuale Umsatz dient als Grundlage zur Bestimmung der absoluten im Test entstandenen Menge dCMP.

2.4 Zellaufschlußverfahren

Zum Zellaufschluß werden die frisch geernteten oder eingefrorenen Algen in Aufschlußpuffer (TRIS-HCl 50 mM; pH 7,5; 1 mM DTT) suspendiert [52], mit salzsäuregewaschenen Glasperlen (Ø = 0.7 mm) vermischt und in einem Stahlbecher in der Vibrogen-Zellmühle (F. Bühler, Tübingen) durch Schütteln aufgebrochen. Zur Kühlung des Bechers wird durch einen Kühlmantel Eiswasser umgewälzt. Die Temperatur des Aufschlußgutes steigt nur unwesentlich, wenn die Zellmühle in einem Kühlraum bei 0°C aufgestellt ist. Bei höchster Leistung (4500 Upm) schüttelt man die Zellen insgesamt viermal 5 Minuten bei je 2-3 Minuten Pause. Auf einer Glasfritte (D2) wird das Homogenat von den Glasperlen abgesaugt und mit Aufschlußpuffer mehrfach nachgewaschen. Das filtrierte Aufschlußgut wird bei 30 000g (30 Minuten) zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert und der klare, leicht grüne Überstand als Rohextrakt zur Reinigung von Ribonucleotidreduktase verwendet.

Zu Bestimmungen von Ribonucleotidreduktase im Rohsaft, die nur kleine Algenmengen (0,5 ml pcv) erfordern, werden die gewaschenen Algen mit einem Milliliter 50 mM Phosphatpuffer pH 7,50; 1 mM DTT aufgeschlämmt und die Suspension in einer Teflonkapsel mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Man gibt eine gekühlte Stahlkugel (Ø = 1 cm) hinzu und zerschlägt die gefrorene Masse in dem geschlossenen Gefäß durch hochtourige Vibration in einem Mikrodismembrator (Braun, Melsungen). Eine Aufschlußzeit von viermal 1 Minute alternierend mit einer Minute Kühlung in flüssigem Stickstoff war für einen vollständigen Zellaufschluß ausreichend. Das fein zerschlagene Material wird in einen Glashomogenisator gegeben, mit 2 ml des gleichen Puffers versetzt, aufgetaut und gleichmäßig homogenisiert.

Das Rohhomogenat wird 30 Minuten bei 30 000g zentrifugiert, der klare Überstand gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6; 1 mM DTT dialysiert und zum Ribonucleotidreduktase-Test eingesetzt.

2.5 Reinigung der Ribonucleotidreduktase

2.5.1 Fraktionierte Fällungen

Das Rohhomogenat (ausgehend von 1 Ltr. Algenkultur der Zellzahl 200-250) wird durch Zutropfen von 0.1 N Essigsäure auf pH 7,2 (2°C) eingestellt. Unter Rühren fügt man soviel 0,3 %ige Polyäthyleniminlösung (s. u.) zu, daß die Endkonzentration 0,04 % - bezogen auf 3,2 mg/ml Protein - beträgt. Man läßt 20 Minuten nachrühren und zentrifugiert 15 Minuten bei 20 000g. Das hellgrüne Pellet wird mit 80 ml Kaliumphosphatpuffer pH 6,6, 1 mM DTT, 300 mM NaCl aufgenommen, in einem Glashomogenisator homogenisiert und 20 Minuten bei 30 000g abzentrifugiert. Zu dem klaren, grünlichen Überstand wird unter Rühren bei 0°C gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung (pH 7,0; 1 mM DTT) während 30 Minuten bis zur 60 %igen Sättigung zugegeben und eine Stunde nachgerührt. Die Suspension wird 20 Minuten bei 10 000g abzentrifugiert und das Pellet in 3-5 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,6, 1 mM DTT aufgenommen und 4-6 Stunden dialysiert. Das trübe Dialysat zentrifugiert man 20 Minuten bei 20 000g und setzt den klaren, farblosen Überstand zur weiteren Trennung ein.

Herstellen der PEI-Lösung [53]

10 ml PEI (PEI 600, prakt.; Serva) werden mit 90 ml 50 mM TRIS-HCl pH 7,2 (2°C) verdünnt; mit konz. HCl auf pH 7,2 (2°C) eingestellt und gegen den gleichen Puffer 18 Stunden dialysiert. Man verdünnt nochmals 15-fach mit TRIS-Puffer und setzt die gekühlte, für Monate haltbare Stammlösung (0.3 %) zur Fällung ein.

2.5.2 Affinitätschromatographie

Die Trennung der Ribonucleotidreduktase in zwei Untereinheiten erfolgt durch Chromatographie auf N^6-6-(Aminohexyl)-adenosin-2',5'-bisphosphat-Sepharose 4B (Pharmacia). Das zentrifugierte klare Dialysat der Ammoniumsulfatfällung wird auf eine mit 2',5'-ADP-Sepharose gefüllte Säule (2x1 cm) gegeben, die mit 50 mM Kaliumphosphat pH 6,6; 1 mM DTT äquilibriert ist, und das nicht vom Säulenmaterial festgehaltene Protein mit 10 ml/h

als Durchbruchsfraktion (I) aufgefangen. Unspezifisch gebundenes Protein wird durch Waschen mit ca. 10 ml des gleichen Puffers von der Säule gespült (Fraktion II). Man eluiert mit 3 ml 1 mM dATP in 10 mM Phosphatpuffer; 1 mM DTT (Fraktion III) und dialysiert die Lösung (Untereinheit U1) über Nacht gegen 50 mM Phosphat; 1 mM DTT, um das im Test und der folgenden DEAE-Cellulosetrennung in dieser Konzentration störende dATP zu entfernen. Die für sich inaktiven Fraktionen I und III bilden erst in Kombination das katalytisch aktive Enzym. Bei allen folgenden Reinigungsschritten muß deshalb auch die jeweils andere Untereinheit zum Test gegeben werden.

2.5.3 Reinigung der Untereinheit U1

DEAE-Cellulose (DE 32, Whatman) wird vorbehandelt und mit 50 mM Phosphat pH 6,6; 1 mM DTT (Standardpuffer) in einer Säule (1 x 1 cm) äquilibriert. Man trägt die dialysierte Fraktion III der vorangegangenen Affinitätschromatographie mit 20 ml/ h Flußgeschwindigkeit auf, wäscht mit ca. 5 ml des gleichen Puffers nach und eluiert mit soviel 160 mM NaCl im gleichen Puffer, bis kein Protein mehr im Eluat nachweisbar ist (8-10 ml). Ein erneuter Elutionsschritt mit 3 ml 250 mM NaCl in 50 mM Phosphat pH 6,6; 1 mM DTT löst die Ribonucleotidreduktaseuntereinheit (U1) von der Säule. Anschließend wird 6 Stunden gegen Standardpuffer dialysiert.

2.5.4 Reinigung der Untereinheit U 2

Hydrophobe Chromatographie durch Butyl-Agarose

Die Durchbruchsfraktion der Trennung auf 2',5'-ADP-Sepharose wird zur hydrophoben Chromatographie auf eine Säule (4 x 1,5 cm) mit Butyl-Agarose (Miles) gegeben, die vorher gründlich mit 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6; 1 mM DTT gewaschen wurde. Man spült mit dem gleichen Puffer nach und eluiert die Ribonucleotidreduktaseuntereinheit in einem Schritt mit 70 mM NaCl in 50 mM Phosphat, pH 6,6; 1 mM DTT, indem nur die ersten 5 ml in einer Fraktion aufgefangen wurden. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 10 ml/h.

Gelfiltration

Die mit 70 mM NaCl von der Butylagarose eluierte Fraktion wird zur Gelfiltration auf das Gelbett einer mit 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0; 1 mM DTT äquilibrierten Sephadex G-100 (Pharmacia) Säule (60 x 2,5 cm) aufgeschichtet. Man läßt die Probenlösung langsam einsickern und eluiert mit einer Geschwindigkeit von 39 ml/h entsprechend 7,95 ml/h cm^2. Es werden Fraktionen von je 9,75 ml aufgefangen.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelfiltration wird die Säule mit Proteinen bekannten Molekulargewichts kalibriert. Hier betrug die Elutionsgeschwindigkeit jedoch nur 20 ml/h.

DEAE-Cellulose

Die im Rekombinationstest mit Untereinheit 1 aktiven Fraktionen der Gelfiltration werden auf eine mit 50 mM Phosphat pH 6,6, 1 mM DTT, äquilibrierte Säule (1 x 1 cm) mit DEAE-Cellulose (DE 32, Whatman) aufgetragen (20 ml/h), mit 6 ml des gleichen Puffers nachgewaschen und mit 5 ml 110 mM NaCl in 50 mM Phosphat pH 6,6; 1 mM DTT in einem Schritt eluiert. Man fängt die ersten 4 ml des Eluats in einer die Untereinheit enthaltende Fraktion auf. Anschließend dialysiert man 6 Stunden gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6; 1 mM DTT.

Chromatographie auf Hydroxylapatit

Hydroxylapatit (Serva) wird mit 50 mM Phosphat pH 6,6; 1 mM DTT in einer Säule (1 x 1 cm) äquilibriert (10 ml/h). Im gleichen Puffer trägt man die Probe auf und wäscht mit 10 ml nach. Die gebundene Untereinheit läßt sich mit 200 mM Phosphat pH 6,6; 1 mM DTT von der Säule eluieren und wird in einer Fraktion (4 ml) gesammelt. Zum Test dialysiert man mindestens 6 Stunden gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6; 1 mM DTT.

2.6 DNA-Bestimmung

Eine DNA-Analyse auf der Basis der Phosphatbestimmung erweist sich in pflanzlichem Material als besonders störanfällig und erfordert die langwierige Abtrennung von RNA im analytischen Bereich. Stattdessen ist der Nachweis von 2'-Desoxyribose vorteilhaft, da dieser Zucker erst bei saurer Hydrolyse aus DNA gebildet wird und nicht frei in der Zelle vorkommt. Wir wählten als schnelle (2 h), spezifische und empfindliche Nachweismethode die Umsetzung von 2'-Desoxyribose mit 3,5-Diaminobenzoesäuredihydrochlorid (DABA · 2 HCl) und die fluorimetrische Bestimmung des entstehenden Reaktionsproduktes [54,55].

Von einer gut durchmischten Algensuspension der relativen Zellzahl 200-300 ($3\text{-}5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) werden 20 ml entnommen, die Zellen auf Glasfaserfiltern gesammelt und zweimal mit 10 ml Wasser nachgewaschen. Durch den Filter saugt man nacheinander 5 ml Aceton, 5 % Trichloressigsäure (4°C) und 5 ml Ethanol/Ether (3:1) und - alternierend nach jedem Extraktionsschritt - Luft, um Filter und Zellen zu trocknen.

Die Filter werden mit 0,4 ml 20 % (w/w) frisch angesetzter DABA · 2 HCl-Lösung getränkt, 40 Minuten bei 60°C inkubiert und die Reaktionslösung anschließend mit 4 ml 0,6 N Perchlorsäure verdünnt. Zur vollständigen Extraktion des gebildeten Reaktionsproduktes schüttelt man eine Stunde und mißt die Fluoreszenz der filtrierten Lösung in einem Spektralfluorimeter (Baird-Atomic). Anregungswellenlänge: 430 nm; Fluoreszenz 530 nm . Eine Eichung wird mit Thymus-DNA als Standard durchgeführt, wobei sich eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz und der eingesetzten Menge DNA bis zu 30 µg ergibt.

Käufliche 3,5-Diaminobenzoesäure wird zur Bildung des Hydrochlorid mit soviel heißer 6 N HCl versetzt, daß eine möglichst konzentrierte Lösung entsteht, dann werden 2 g Aktivkohle eingerührt. Man filtriert die Lösung und läßt 2 Stunden im

Eisbad auskristallisieren. Man saugt auf einer Glasfritte ab und trocknet die schwach gelben Kristalle 3 Stunden bei 60°C in einem heizbaren Exsikkator.

2.7 Bestimmung der DNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität

Das Enzym wird durch Einbau radioaktiv markierter Desoxyribonucleotidphosphate in DNAase-aktivierte DNA als Primer-Template bestimmt. Zur Messung sammelt man die DNA als säureunlösliches Präziptitat auf Glasfaserfiltern; die eingebaute Radioaktivität ist ein Maß der Enzymaktivität. Eine DNA-Polymerase aus der verwandten Grünalge Chlorella pyrenoidosa (211-8b) wurde teilgereinigt und charakterisiert [13], so daß wir für Scenedesmus ähnliche Testbedingungen wählten.

In einem Testvolumen von 250 µl wurden gemischt:

			Konz. im Test
100 µl	Enzymlösung (Probe) in 50 mM TRIS-HCl pH 8,0		50 mM
50 µl	TRIS-HCl pH 8,5	150 mM	
einer	KCl	500 mM	100 mM
Mischung	$MgCl_2$	50 mM	10 mM
	2-Mercaptoethanol	50 mM	10 mM
	$EDTA\text{-}Na_4$	2 mM	0.4 mM
10 µl	1 µCi methyl[^{3}H]dTTP	1 mM	40 µM
10 µl	dCTP	1 mM	40 µM
10 µl	dGTP	1 mM	40 µM
10 µl	dTTP	1 mM	40 µM
10 µl	H_2O	-	-
50 µl	Thymus DNA, aktiviert		50 µg

spez. Aktivität des methyl[^{3}H]Desoxythymidintriphosphats: 30 Ci/mmol

Durch Zugabe des Enzyms startet man die Reaktion, inkubiert 1 Stunde bei 30°C und stoppt den weiteren Einbau durch Abkühlen im Eisbad. Ein aliquoter Teil der Testmischung (50 µl) wird auf Glasfaserfilter (Whatman, GF/C) pipettiert, die in Waschkörbchen gesammelt und jeweils 15 Minuten in folgenden eiskalten Lösungen gewaschen werden:

1. 10 % Trichloressigsäure - 1 % $Na_4P_2O_7$
2. 5 % Trichloressigsäure - 1 % $Na_4P_2O_7$
3. 5 % Trichloressigsäure - 1 % $Na_4P_2O_7$
4. Ethanol/Ether (3:1)
5. Ether

Nach dem Trocknen unter einer IR-Lampe versetzt man mit 3 ml Szintillator (1 Liter Toluol, 5 g PPO, 0,5 g POPOP) und bestimmt die Radioaktivität (cpm).

Zur Optimierung der Testbedingungen und Charakterisierung des enzymatischen Nucleotideinbaus werden mehrere Testparameter variiert, so daß die angegebene Zusammensetzung nur in wenigen Polymerase-Bestimmungen eingehalten wurde. Abweichungen werden jeweils besonders vermerkt.

Aktivierung der DNA zum DNA-Polymerasetest

Die zum Test eingesetzte DNA wurde zuvor durch Pankreas-Desoxyribonuclease-Behandlung aktiviert [56]. Die dabei entstehenden "nicks" mit freien 3'OH-Endgruppen erwiesen sich für die meisten eukaryontischen DNA-Polymerasen als geeignete Matrizen.

5 mg (1,7 ml) Kalbsthymus-DNA-Lösung (Boehringer) werden mit 3,3 ml des angegebenen Puffers (s. u.) und 10 l (5 µg) Pankreas-Desoxyribonuclease I EC 3.1.4.5 (Boehringer) 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend unter Zugabe von NaCl (2,5 M) 15 Minuten auf 58°C erwärmt. Man kühlt im Eisbad ab und dialysiert je 20 Stunden zunächst gegen 0,2 M KCl, dann gegen 0,001 M KCl-Lösung.

100 ml Puffer enthält in 10 mM TRIS-HCl, pH 7,4:

50 mg Rinderserumalbumin (BSA)
1 mMol $MgCl_2$
1 mMol KCl

2.8 Bestimmung der Desoxynucleotidtriphosphat-Pools

Die Bestimmung der Desoxynucleotidtriphosphate wird nach der erstmals von Skoog et al. beschriebenen Methode durchgeführt [57]. Synthetische, doppelsträngige, alternierend verknüpfte Polynucleotide wie Poly[d(G-C)] und Poly[d(A-T)] anstelle von DNA zur DNA-Polymerasereaktion eingesetzt. Soll etwa dATP bestimmt werden, wählt man Poly[d(A-T)] als Matrize und setzt das komplementäre, radioaktiv markierte Thymidintriphosphat zum Test ein. Da der enzymkatalysierte Einbau der Nucleotide in dem Testsystem durch das in geringster Menge vorhandene (zu bestimmende) Desoxynucleotid limitiert ist und das komplementäre, radioaktiv markierte Nucleotid durch Basenpaarung nur in gleichem Maße eingebaut wird, ist die säureunlösliche polynucleotidgebundene Radioaktivität ein Maß für die Konzentration des gesuchten Desoxyribonucleotids.

Extraktion der Nucleotide

20 ml einer Algensuspension (ca. $6 \cdot 10^7$ Zellen) werden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, dreimal mit Wasser gewaschen, mit 1 ml Wasser resuspendiert und im Dismembrator aufgeschlossen (4x1 Minute). Das zerkleinerte, gefrorene Aufschlußgut nimmt man mit 5 ml einer auf -20°C abgekühlten Lösung (3,6 Teile Methanol, 0,6 Teile H_2O, 0,8 ml verd. Chelex -Suspension, s.u.) auf und gibt die Suspension in vorgekühlte Zentrifugengläser. Zur Extraktion der Nucleotide wird die 60 %ige methanolische Lösung mindestens 20 h bei -20°C aufbewahrt. Das unlösliche Material sowie der polymere Komplexbildner Chelex wird durch Zentrifugation bei 20 000 g; 15 Min. entfernt und 3 ml des Überstandes gefriergetrocknet. Man nimmt den Rückstand in 2 ml TRIS-HCl, pH 8,2, auf und setzt diese Lösung zur Bestimmung der Desoxyribonucleotide ein.

Der Zusatz des polymeren Komplexbildners "Chelex" (BIO-RAD), einem matrixgebundenen Iminodiacetat, dessen günstiger Einfluß bei der dNTP-Bestimmung in Weizenembryonen von H. Müller gefunden wurde [58], sollte auch im Algenextrakt

einen metallkatalysierten Abbau der Nucleosidtriphosphate verhindern. Chelex wurde nach Willard durch Waschen mit NH_4OH, HCl und H_2O vorbehandelt und je ein Teil sedimentiertes Gel mit Wasser auf das 5-fache Volumen aufgefüllt.[58]

dNTP-Bestimmung

DNA-Polymerase I (EC 2.7.7.7) aus E. coli (Boehringer, Grade I) wird mit einer Mischung von Enzymverdünnungslösung und Glycerin (1:1) 25-fach verdünnt und bei -20°C aufbewahrt 10 µl dieser Lösung entsprechen 1 U Enzymaktivität [59].

Enzymverdünnunslösung

50 mM TRIS-HCl, pH 7,5
100 mM $(NH_4)_2SO_4$
10 mM 2-Mercaptoethanol
1 mg/ml Rinderserumalbumin

Das Reaktionsgemisch enthält in einem Volumen von 100 µl:

50 µl Nucleotidextrakt in TRIS-HCl, pH 8,2, zur Bestimmung von dCTP, dGTP (25 µl zur Bestimmung von dATP, dTTP und 25 µl Puffer)

50 µl "Polymerase-Puffer" (s. u.) mit folgender Zusammensetzung:
1,5 nMol Matrize Poly[d(A-T)] bzw. Poly[d(G-C)]
0,1 U [59] DNA-Polymerase (E. coli)
1 µCi [^{3}H]dATP zur Bestimmung von dTTP
[^{3}H]dTTP zur Bestimmung von dATP
[^{3}H]dCTP zur Bestimmung von dGTP
[^{3}H]dGTP zur Bestimmung von dCTP

Die spezifischen Aktivitäten der eingesetzten, tritiummarkierten Nucleotide betragen:

[8-^{3}H]dATP	29 Ci/mmol
[8-^{3}H]dGTP	8 Ci/mmol
[5-^{3}H]dCTP	22 Ci/mmol
methyl[^{3}H]dTTP	30 Ci/mmol

Der "Polymerase-Puffer" enthält: 50 mM TRIS-HCl, pH 8,2
5 mM $MgCl_2$
1 mM 2-Mercaptoethanol

Das Reaktionsgemisch wird 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Abkühlen im Eisbad stoppt man die Reaktion und pipettiert 50 µl des Testgemisches auf Glasfaserfilter (Whatman, GF/C). Die Filter werden wie oben beschrieben (2.7) in Waschkörbchen jeweils 15 Minuten gewaschen und nach dem Trocknen unter einer IR-Lampe mit 3 ml Szintillator (1 Ltr. Toluol; 5 g PPO; 0,5 g POPOP) versetzt und die Radioaktivität (cpm) bestimmt. Parallel zur Bestimmung der Proben wird jeweils unter gleichen Bedingungen eine Eichkurve mit bekannten Mengen dNTP im Bereich von 0-20 pMol erstellt. Da Zellzahl und DNA-Gehalt der zur Extraktion eingesetzten Algen bekannt sind, kann die Poolgröße sowohl pro Zelle als auch pro µg DNA angegeben werden.

2.9 Dünnschichtchromatographische Trennungen von Nucleosiden und Nucleotiden

In Ribonucleotidreduktasetests laufen, wenn unreine Enzympräparationen eingesetzt werden, eine Vielzahl den Umsatz zum Desoxyribonucleotid störende Reaktionen ab. Eine wichtige Konkurrenz der Ribonucleotidreduktion ist die Veränderung von Substrat, Produkt und Nucleotideffektor durch Abbau von Phosphatresten oder weiterer Phosphorylierung. Die Erfassung von Art und Ausmaß dieser enzymatischen Reaktionen ist deshalb wichtig und ihr Ergebnis kann als ein Reinheitskriterium einer Ribonucleotidreduktasepräparation angesehen werden. Auch zur Reinheitskontrolle radioaktiv markierter Nucleotide

sowie zur Überprüfung des enzymatischen Abbaus der Testmischung durch alkalische Phosphatase müssen rasche Trennungen sowie die eindeutige Zuordnung der getrennten Substanzen bei Einsatz nur geringer Substanzmengen möglich sein.

Zur Gruppentrennung von Nucleotiden einerseits und Nucleosiden und Nucleobasen andererseits wird die Probe (5-10 µl) auf PEI-Dünnschichtplatten aufgetragen und mit Wasser entwickelt [60]. Alle phosphorylierten Substanzen bleiben am Startfleck haften, während die Nucleoside und Basen mit der Laufmittelfront wandern. Nach dem Trocknen werden die getrennten Nucleotide und Nucleoside im UV-Licht lokalisiert und ihre Radioaktivitätsverteilung am Dünnschichtscanner aufgezeichnet.

Eine weitere dünnschichtchromatographische Trennmethode, die gegenüber der publizierten Vorschrift nur leicht modifiziert wurde, erlaubt die Trennung von Basen, Nucleosiden sowie deren 5'-Mono-, Di- und Triphosphaten [61]. Durch die Verwendung borsäurehaltiger Laufmittel gelingt die Differenzierung von Ribo- und Desoxyverbindungen aller Phosphorylierungsstufen.

Zur Trennung werden Proben (10-15 µl) auf PEI-Dünnschichtplatten (20x20 cm) 3 cm vom unteren Rand der Platten aufgetragen und in Laufmittel I zunächst 2 cm über die Startlinie hinaus entwickelt. Die Platte wird ohne sie zu trocknen anschließend in Laufmittel II bis zu 14 cm über der Startlinie chromatographiert (ca. 90 Min. Trennzeit). Nach dem Trocknen erfolgt die Lokalisation der als Carrier zugegebenen Nucleotide im UV-Licht sowie die Aufzeichnung der Radioaktivitätsverteilung am Dünnschicht-Scanner.

Laufmittel I: 1 M Ammoniumacetat
2,5 % Borsäure pH 7,0

Laufmittel II: 2,5 M Ammoniumacetat
3,6 % Borsäure pH 7,0

2.10 Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Reinheitskontrolle von Proteinen sowie zur Molekulargewichtsbestimmung wurden analytische, diskontinuierliche SDS-Gelelektrophoresen nach den von Laemmli beschriebenen Bedingungen in Polyacrylamidgelen durchgeführt [62].

Probenvorbereitung

Proteinproben mit ca. 10 µg Protein/Bande werden mit Wasser auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und mit 100 µl 72 % TCA über Nacht bei 0°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren in einer Tischzentrifuge nimmt man das Präzipitat mit 20 bis 40 µl Extraktionsmedium auf und neutralisiert mit TRIS (1 M) bis zum blauen Farbumschlag des zugesetzten Bromphenolblau. Die Lösung wird 1 Stunde bei 40°C belassen und anschließend zur Denaturierung 1,5 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Proben können entweder eingefroren oder direkt zur Elektrophorese eingesetzt werden.

Extraktionsmedium:

In 50 ml 0,125 M TRIS-HCl pH 6,8 werden gelöst:

1 g Natriumdodecylsulfat
0,5 g 2-Mercaptoethanol
5 g Saccharose
15 mg Bromphenolblau

Präparation des Trenngels (8 % Acrylamid)

12	g	Acrylamid
315	mg	N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS)
15	g	Saccharose
45	mg	Natriumsulfit
150	mg	Natriumdodecylsulfat
150	µl	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)
135	ml	0,375 M TRIS-HCl Puffer pH 8,8

Die festen Bestandteile werden in ca. 115 ml 0,375 M TRIS-HCl Puffer pH 8,8 (Trenngelpuffer) gelöst und mit dem gleichen Puffer auf ein Endvolumen von 150 ml gefüllt. Zu 50 ml dieser Lösung setzt man nach dem Entlüften im Wasserstrahlvakuum 1 ml 2 % Ammoniumperoxodisulfatlösung als Starter zu und polymerisiert zunächst einen Polyacrylamidblock als unteren Gelabschluß in die geschlossene, um 45° geneigte Apparatur (PANTA-PHOR; H. Stegemann) ein [63]. Nach einer Stunde Polymerisation werden die restlichen 100 ml Trenngelmonomerlösung in gleicher Weise entlüftet, mit 2 ml Peroxidsulfat (2 %) gestartet und durch Miracloth blasenfrei in die gekühlte (10°C) Apparatur bis zu einer Gelhöhe von ca. 14 cm eingefüllt. Man überschichtet das Trenngel, um eine ebene und glatte Geloberfläche zu erhalten, mit Trenngelpuffer und läßt abermals eine Stunde stehen.

Präparation des Stacking Gels (4 %)

50	ml	0,125 M TRIS-HCl, pH 6,8
2,0	g	Acrylamid
50	µl	TEMED
15	mg	Natriumsulfit
50	mg	SDS
55	mg	BIS

Starten der Polymerisation mit: 2 ml $(NH_4)_2S_2O_8$ (2 %)

Die entlüftete Lösung wird, nachdem der überschichtete Trenngelpuffer von der nun festen Geloberfläche abgesaugt ist, bis zu einer Höhe von 2,5 cm auf das Trenngel in die 3 mm breite Elektrophoresekammer gegossen, wobei ein Trogformer (Kamm) am oberen Rand aufgesetzt wird und als Matrize zur Ausformung der Probentaschen dient. Nach der Polymerisation des Stackinggels entfernt man den Kamm und gibt den Elektrodenpuffer in die nun waagrecht stehende Apparatur. Durch Unterschichten des Elektrodenpuffers mit den in Extraktionsmedium gelösten Proteinproben füllt man die Probentaschen und trennt unter Kühlung im elektrischen Feld zunächst bei 30 mA (30 Minuten), später bei 45 mA. Nach ca. 6-7 Stunden Elektrophorese wird das Polyacrylamidgel entnommen und die getrennten Proteine über Nacht

im Färbebad fixiert und angefärbt. Entfärben erfolgt unter leichter Bewegung des Entfärbebades, gegebenenfalls durch Zugabe geringer Mengen eines Anionenaustauschers (Dowex 1x2), bis zur Farblosigkeit des Untergrundes [64].

Zur Dokumentation werden die Gele im Durchlicht photographiert oder die Intensität der Banden densitometrisch mit einem Eppendorf-Photometer (Filter 578 nm) bestimmt.

Färbebad:

1,25	g	Coomassie Brilliant Blue R 250	
150	g	TCA	auf 2,5 Ltr. mit
175	ml	Eisessig	Wasser auffüllen
500	ml	Methanol	

Entfärbebad:
Methanol, Eisessig, Wasser = 2:3:15 (v/v/v)

Elektrodenpuffer (pH 8,3)
Mit Wasser auf 2,5 Liter auffüllen

7,56	g	TRIS (0,025 M)
36,00	g	Glycin (0,192 M)
2,50	g	SDS

2.11 Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation mit Saccharose-Gradienten

Zur Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation [65] werden lineare Saccharosegradienten durch Mischung zweier Saccharoselösungen (5 % und 20 % in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,60; 1 mM DTT) mit einem LKB Ultrograd Gradientenmischer hergestellt. Die gemischte Rohrzuckerlösung wird in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (14 ml Volumen) eingepumpt (28 ml/h). Die fertigen Zuckergradienten beläßt man weitere 4-10 Stunden bei 2°C, überschichtet mit der Proteinlösung und zentrifugiert unter Kühlung bei 2°C 6-40 Stunden im SW 40 Schwingbecher-Rotor

bei 40 000 Upm (g_{max} = 248 000 g). Nach der Zentrifugation sticht man die Röhrchen am Boden an und fraktioniert (0,4 ml/ Fraktion) die Zuckerlösung in Reagenzgläser (ISCO Density Fractionator, Model 640). Die Bestimmung der Saccharose-konzentration der einzelnen Fraktionen erfolgt durch Messung des Brechungsindex. Anhand der Position von Eichproteinen bekannter Sedimentationskonstante kann auf den S-Wert und annähernd auch auf das Molekulargewicht eines unbekannten, zu bestimmenden Proteins geschlossen werden, wenn auch dessen Wanderungsstrecke vom Meniskus des Gradienten bekannt ist. Der Berechnung liegt die Annahme zugrunde, daß sich die partiellen spezifischen Volumina des zu messenden Proteins und der Markerproteine möglichst ähnlich sind und im Gradienten keine Dissoziations- oder Assoziationsgleichgewichte bestehen [66].

3. ERGEBNISSE

3.1 Nachweis von Ribonucleotidreduktase in der Alge Scenedesmu

3.1.1 Verlauf der Enzymaktivität im Zellzyklus

Eigene Vorarbeiten hatten zum Nachweis von Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Rohhomogenaten aus homokontinuierlich und synchron kultivierten Zellen von Scenedesmus obliquus geführt [15]. Die Enzymaktivität zeigt einen zellzyklusabhängigen, peakförmigen Verlauf (Abb. 3), der streng mit der S-Phase (DNA-Synthesephase der Zellen) übereinstimmt und in dieser Eigenschaft der Ribonucleotidreduktase anderer synchronisierter eukaryontischer Zellen (L-Zellen der Maus; Fibroblastenkultur des chinesischen Hamsters und Hefe, Saccharomyces cerevisiae) ähnelt.

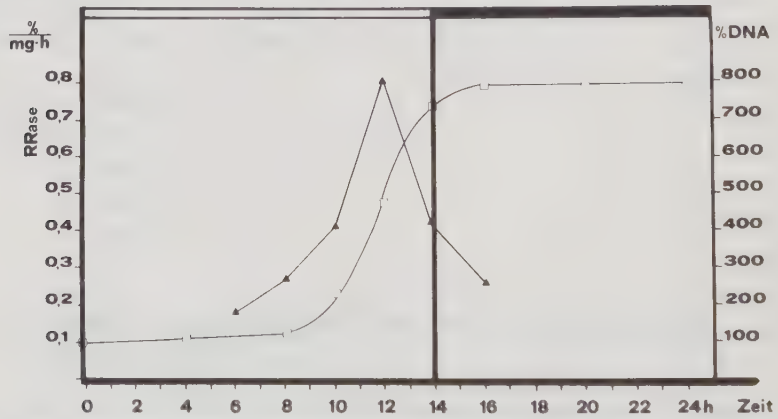


Abb. 3: Ribonucleotidreduktase-Aktivität ▲ (% Umsatz/mg·h) und prozentuale Änderung des DNA-Gehaltes/ml Zellsuspension während des Zellzyklus; 14:10 Stunden Hell-Dunkel-Wechsel, Maximale Aktivität: 4 pMol/h·mg

Die Interpretation einer zellzyklusabhängig schwankenden Enzymaktivität kann allerdings zu falschen Schlüssen führen [67], wenn die spezifische Enzymaktivität wie in Abb. 3 aufgetragen wird. Sie normiert die gemessene Enzymaktivität auf den Proteingehalt, der selbst zellzyklusabhängig variiert. Es ist deshalb sinnvoll,

die Enzymaktivität in Algenkulturen auch auf das Volumen der eingesetzten Zellsuspension (unter Voraussetzung konstanter Zellzahl) zu beziehen. Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Scenedesmus zeigt dabei wiederum den gleichen peakförmigen Kurvenverlauf [15], so daß die Auftragung der spezifischen Aktivität zulässig ist.

Unklar bleibt nach diesen vorläufigen Versuchen die Phosphorylierungsstufe des Substrats in vivo, da in Rohhomogenaten ein zeitabhängiger Umbau von Substrat und Produkt durch Phosphatase- und Kinasewirkung katalysiert wird. Eindeutig kann das Nucleosidmonophosphat ausgeschlossen werden; als wahrscheinlichste Substrate dürfen die Nucleosiddiphosphate gelten. Tabelle 1 zeigt einige weitere Ergebnisse der Vorarbeiten:

Tabelle 1: Relative Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von Zusätzen und Auslassungen der Testzusammensetzung. 100 % = Aktivität des Standardtests

Veränderung	Relative Aktivität %
Standardtest (DTT; ATP; Mg^{2+}; Fe^{2+})	100
- DTT; + 10 mM Liponsäure, reduziert	36
- DTT; + 5 mM 2-Mercaptoethanol	44
- ATP 3,5 mM	67
+ 350 µM dATP	12
+ 3,5 mM dATP	8
+ 350 µM dTTP	60
+ 3,5 mM dTTP	15
- Fe^{2+}	105
- Mg^{2+}	95
+ Coenzym B_{12} (25 µM)	55
+ N-Hydroxyharnstoff (12 mM)	61

Der aktivierende Effekt von ATP kann entweder auf allosterischer Beeinflussung der Enzymaktivität beruhen, oder das Nucleotid wirkt der im Rohsaft ablaufenden Substratdephosphorylierung entgegen. Die ausgeprägte, konzentrationsabhängige Inhibierung des Desoxynucleosidtriphosphats (dTTP und dATP) kann gleichfalls nicht sicher als allosterische Hemmung interpretiert

werden. Reduktionsmittel im Test ist Dithiothreit (DTT), das nur teilweise durch Monothiole (2-Mercaptoethanol) ersetzt werden kann und in vivo Thioredoxin als Elektronendonator nahelegt.

Eine Abhängigkeit des Umsatzes von Coenzym B_{12} und Metallionen (Mg^{2+} und Fe^{2+}) wurde nicht beobachtet, obwohl die Hemmung mit Hydroxyharnstoff auf eine Beteiligung von Eisenionen im Enzym hindeutet. Eine Einordnung zu dem Enzym des Typ I erscheint nach diesen Befunden gerechtfertigt.

Vor einer weiteren Reinigung und Charakterisierung der Scenedesmus Ribonucleotidreduktase war es angesichts der geringen Enzymaktivitäten (5-30 pMol/h) ratsam, die Testbedingungen systematisch zu variieren. Zum anderen schien es denkbar, über eine Beeinflussung der Enzymaktivität oder deren Regulation in vivo bessere Ausgangsbedingungen für die Enzymreinigung zu schaffen.

3.1.2 Variation der Testbedingungen im Rohextrakt

3.1.2.1 Einfluß von pH-Wert und Ionenstärke

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität (pMole Deoxycytidin/Stunde) vom pH-Wert des Testgemisches zeigt ein Optimum bei pH 6,6 (Abb. 4). Das zentrifugierte Rohhomogenat wird 8 Stunden gegen 50 mM MES-Puffer, 1 mM DTT verschiedener pH-Werte dialysiert und die Enzymaktivität mit ATP als Effektor getestet. Während der Inkubation konnte keine zeitliche Änderung des pH-Wertes gemessen werden. Ribonucleotidreduktase wird i. a. bei pH 7,5 gemessen, die Änderung des pH-Wertes auf pH 6,6 für das Algenenzym bewirkt also eine Steigerung der meßbaren Enzymaktivität auf das 5-fache.

Im Gegensatz zu den meisten anderen (s. u.) bekannten RRasen, die im Bereich von pH 7-8 breite pH-Optima aufweisen, liegt das Maximum hier um 0,5-2,0 pH-Einheiten zu geringeren pH-Werten hin verschoben und die Kurve zeigt einen relativ schmalen optimalen Bereich von 0,4 pH-Einheiten mit mehr als 90 % der Aktivität. In Tabelle 2 sind zum Vergleich einige

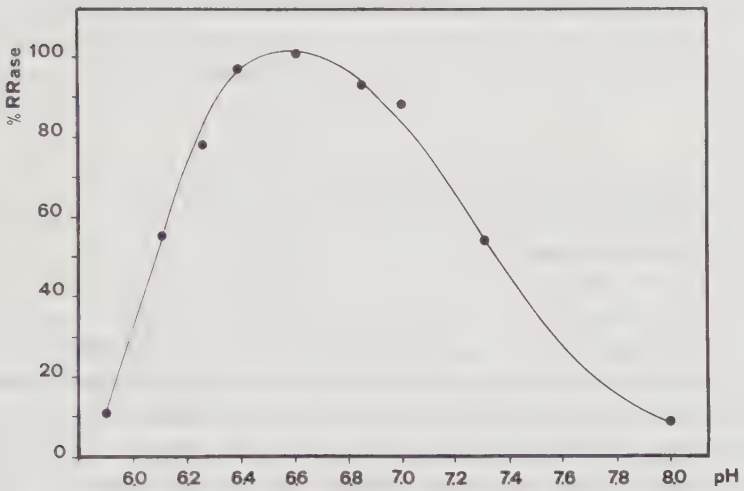


Abb. 4: Abhängigkeit der Ribonucleotidreduktase-Aktivität vom pH-Wert im Testgemisch; 50 mM MES-Puffer (pK_a = 6,15) 100 % = 160 pMol/h gebildetes Desoxycytidin

pH-Optima von Ribonucleotidreduktasen verschiedener Herkunft angegeben. Ähnlichkeit besteht lediglich zum Enzym aus Knochenmark mit einem pH-Optimum von pH 7,0. Auch andere Ribonucleotidreduktasen tierischen Ursprungs werden meist bei pH 7,0 getestet [68] und kommen deshalb dem Algenenzym am nächsten. Einen extremen Einzelfall stellt das Coenzym-B_{12}-abhängige Enzym des Pilzes Pithomyces chartarum dar [77], der bislang eine Einordnung nicht zuläßt. Da die Enzymaktivität mit einem unspezifischen und nur wenig empfindlichen Test bestimmt wurde, sollte die Bestätigung des Befundes auf andere Weise abgewartet werden.

Tabelle 2 : pH-Optima einiger Ribonucleotidreduktasen

Herkunft der RRase	pH-Optimum
E. coli	7,5-8,1
Seeigel-Ei	8,5
Knochenmark (Kaninchen)	7,0
Euglena gracilis	8,2
Lactobacillus leichmannii	7,6
Pithomyces chartarum	5,8

Form und Lage der in Abb. 4 dargestellten pH-Abhängigkeit der Ribonucleotidreduktase-Aktivität könnte auch durch eine Überlagerung unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeiten mit der pH-abhängigen Stabilität des Enzyms zustande kommen. In einem Kontrollversuch wird der Rohextrakt 8 Stunden bei verschiedenen pH-Werten belassen und anschließend alle Proben gegen MES-Puffer pH 6,6 dialysiert und getestet. Im Bereich von pH 5,8 bis pH 8,2 ergeben sich nur geringe, unregelmäßige Schwankungen der Enzymaktivität um einen Mittelwert ($\pm$ 15 %). Diese Kontrolle zeigt, daß die in Abb. 4 dargestellte pH-Abhängigkeit ausschließlich die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit wiedergibt und in dem untersuchten Bereich keine wesentlichen Unterschiede der Stabilität bestehen.

Behandlung mit Essigsäure führt bis pH 5,5 zu einem Ausfällen von Protein, das geringe Mengen Ribonucleotidreduktase-Aktivität enthält. Erniedrigt man den pH-Wert weiter auf pH 5,0 und bestimmt die Enzymverteilung im säuregefüllten Pellet und im Überstand, wird Ribonucleotidreduktase ausschließlich in der säurefällbaren Fraktion gefunden. Die Ausbeute liegt trotz rascher Ausführung nur bei 15 %. Eine Säurefällung als Reinigungsmethode - wie bei dem Enzym aus Rattenleber praktiziert [68] - scheidet somit aus.

Bei optimalem pH-Wert (pH 6,6) wird die Enzymaktivität nur geringfügig von der Art des Puffers beeinflußt ($\pm$ 10 %), wie sich beim Vergleich je 50 mmolarer Lösungen von Phosphat, TRIS-Acetat, MES und HEPES zeigt. In allen weiteren Tests

findet deshalb 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6 mit 1 mM DTT als SH-Schutzreagenz Verwendung. Eine besonders ausgeprägte Hemmung der Enzymaktivität in Gegenwart von Phosphat - wie in E. coli gefunden - kann nicht beobachtet werden.

3.1.2.2 Einfluß hoher Salzkonzentrationen und Detergenzien

Die Möglichkeit, daß RRasen an Zellmembranen assoziiert oder gar als integrales Protein in Membranen eingelagert sind, läßt sich - besonders bei den bisher nicht untersuchten Enzymen in Pflanzen - nicht a priori ausschließen. Zwar gelten RRasen als lösliche Proteine, die bisher in keinem Organismus als typische Membranbestandteile identifiziert wurden, doch ließe sich die geringe Enzymaktivität in Rohhomogenaten auch dadurch erklären, daß nur ein kleiner Anteil durch den mechanischen Zellaufschluß in Lösung gebracht und im Test erfaßt werden kann.[97] Andererseits muß auch die Zerstörung essentieller Strukturen in Erwägung gezogen werden. Die Bedeutung der richtigen Wahl des Zellaufbruchs wird evident, wenn in E. coli allein durch schonende Zellysis mit Lysozym eine 20-fache Enzymaktivitätssteigerung gegenüber mechanisch zerstörten Zellen erbracht werden konnte [69]. Da andererseits in vitro nur wenige Prozent der zur DNA-Synthese erwarteten Enzymaktivität gemessen wird, deutet beides auf eine besondere, labile "Organisationsform" des Enzyms hin, die jedoch einer Isolierung widersteht. Es ist deshalb wünschenswert, möglichst schonende Bedingungen bei der Gewinnung von Rohextrakten einzuhalten.

Demgegenüber erfordert der Aufschluß der Zellwand von Scenedesmus besonders rigide Bedingungen, die nicht zu umgehen sind. So schlugen alle Versuche fehl, die Zellen durch Ultraschall oder mit Hilfe einer Yeda-Press durch plötzliche Dekompression von 150 atü auf Normaldruck aufzubrechen. Auch die Kombination der beiden Verfahren mit wiederholtem Einfrieren und Auftauen erbrachte keinen Erfolg.

Eine Membranassoziation der Ribonucleotidreduktase müßte in Betracht gezogen werden, wenn sich in Anwesenheit von Detergenzien oder hoher Salzkonzentration bei dem Zellaufbruch wesentliche Steigerungen der Enzymaktivität im Rohextrakt ergeben.

Zunächst wurde der Enzymtest in Gegenwart verschiedener Detergenzien steigender Konzentration durchgeführt, um deren Einfluß auf die Enzymaktivität abschätzen zu können.

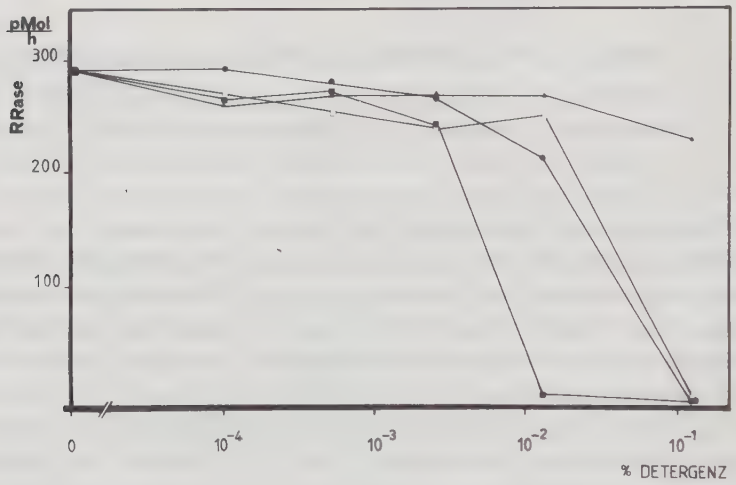


Abb. 5: RRase-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Detergenzien im Testgemisch.

	Ladung
(▲)Triton X 100	o
(□)Embigen BB	+ -
(●)Deoxycholat	-
(■)Cethyltrimethylammoniumbromid	+

Abb. 5 zeigt die Ribonucleotidreduktaseaktivität bei Variation von Art und Konzentration der Detergenzien im Enzymtest. Es wurde je ein Detergenz unterschiedlicher Ladung eingesetzt, und zwar: Triton X 100, Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid, Natriumdesoxycholat und Embigen BB, ein N-Alkylbetain. Eine Steigerung ist in keinem Fall zu erkennen, lediglich das nichtionische Detergenz (Triton X 100) bewirkt bis zu einer Konzentration von 0,1 % keinen wesentlichen Aktivitätsverlust. Am empfindlichsten wird die Enzymaktivität durch das positiv geladene Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumion gestört, das auch mit Nucleinsäuren stabile Salze bildet. Die Wirkung des

Detergenz kann durch eine Überlagerung der Bindung von Substrat und Effektor und der Einwirkung auf das Enzym gedeutet werden.

Der Zellaufschluß gleicher Algenmengen (1 ml pcv) in Gegenwart von 0,1 % Triton X 100 oder durch Steigerung der Ionenstärke mit NaCl führt zu keiner Enzymaktivitätserhöhung (Tabelle 3), so daß zumindest aufgrund dieses Experiments nicht auf eine Membranassoziation der Ribonucleotidreduktase geschlossen werden kann. Weitergehende Studien mit Detergenzien versprechen deshalb keinen Erfolg.

Tabelle 3 faßt den Einfluß von Detergenz und steigender Ionenstärke im Aufschlußpuffer auf die Enzymaktivität zusammen:

Tab. 3: Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Aufschlußpuffers

Aufschlußpuffer	RRase-Aktivität pMol/h	Relative Enzymaktivität %
50 mM Kaliumphosphat, pH 6,6	161	100
" + 0,25 M NaCl	139	86
" + 0,50 M NaCl	148	92
" + 1,00 M NaCl	161	100
" + 0,1 % Triton X 100	146	91

Die Rohhomogenate werden jeweils gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6; 1 mM DTT dialysiert und zum Test eingesetzt.

Bestimmt man Ribonucleotidreduktase in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an NaCl, so erweist sich die hohe Empfindlichkeit der Enzymaktivität gegenüber Salzlösungen, wie sie auch für das Enzym aus Hefe beschrieben wurde. Abb. 6 zeigt die Abhängigkeit der Ribonucleotidreduktaseaktivität in Gegenwart unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen im Testgemisch.

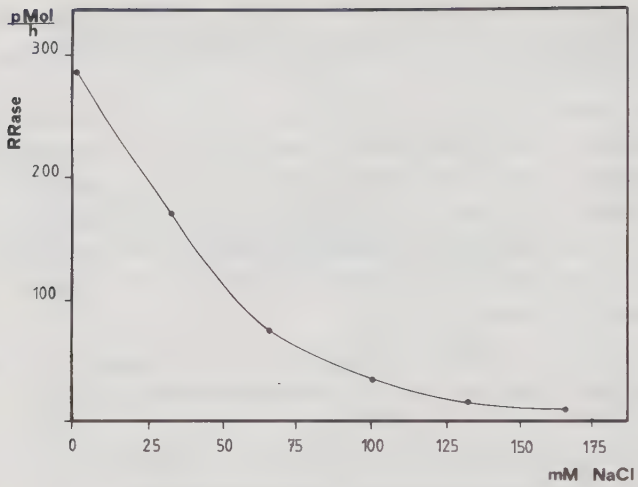


Abb. 6: Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener NaCl-Konzentrationen im Testgemisch Phosphatkonzentration: 33 mM

Offenbar wird die katalytische Aktivität durch hohe Ionenstärke stark beeinträchtigt, während die Wirkung auf die Stabilität des Enzyms gering ist. Dies kann aus der Tatsache geschlossen werden, daß die Enzymaktivität nach Einwirkung von 1 M NaCl und anschließender Dialyse wieder zum Kontrollwert ansteigt (s. auch Tabelle 3). Der Befund ist wichtig, weil bei vielen Proteintrennungsverfahren wie Ammoniumsulfat-Fällung oder DEAE-Cellulose-Chromatographie mit Salzlösungen hoher Ionenstärke gearbeitet wird. Eine weitere Verminderung der Pufferkonzentration ist nicht sinnvoll, da in 10 mM Phosphatpuffer nur 82 % Kontrollaktivität (50 mM Phosphat pH 6,6) erreicht werden. Ribonucleotidreduktase wird deshalb stets in 0,05 molarem Phosphatpuffer zum Test eingesetzt. Die aktuelle Konzentration im Testgemisch beträgt dann 33 mM.

3.1.2.3 Versuche zur Stabilisierung der Enzymaktivität

Ribonucleotidreduktasen sind Proteine von geringer Stabilität, deren Halbwertszeit in Lösung bei 0°C im Bereich von Stunden oder wenigen Tagen liegt. Selbst die hochgereinigte B1-Untereinheit des Enzyms aus E. coli wird während einer Dialyse bei 20°C in 90 Minuten um 15 % inaktiviert, obwohl DTT als Oxidationsschutz zugefügt ist [70].

Bei -80°C tiefgefrorene Algen können ohne Verlust der Enzymaktivität über Monate gelagert werden. Einmal aufgebrochen, müssen jedoch alle weiteren Manipulationen möglichst rasch durchgeführt werden, da die spontane Inaktivierung des Enzyms nicht verhindert werden kann. In 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6; 1 mM DTT sinkt die Enzymaktivität bei 0°C während 24 Stunden auf 70 %, nach 60 Stunden auf 23 % des Ausgangswertes. Unabhängig von der Reinigungsstufe des Proteins schlugen Stabilisierungsversuche ausnahmslos fehl. Eine spezifische Proteaseverdauung ist damit wohl auszuschließen. Zur Stabilisierung wurden zugesetzt bzw. verändert: Verschiedene Konzentrationen von DTT und 2-Mercaptoethanol; CDP als Substrat, dATP, ATP, Mg^{2+}, EDTA, Triton X-100, Glycerin, Saccharose, Rinderserumalbumin; Lagerung bei verschiedenen pH-Werten und als Ammoniumsulfatsuspension. Auch das Entlüften des Puffers und Sättigung mit Stickstoff, der zur Entfernung letzter Sauerstoffreste durch alkalische Pyrogallollösung geleitet wurde, hatte keinen Erfolg. Konsequenterweise empfiehlt es sich, Reinigungsschritte des Proteins und die Enzymtests so rasch wie möglich durchzuführen und jegliche Lagerung zu vermeiden. Jede Enzympräparation muß deshalb aufs Neue von intakten Zellen ausgehen und "blind", d. h. ohne unmittelbar folgende Überprüfung der Enzymaktivität nach einem Reinigungsschritt, bearbeitet werden.

3.1.3 Stimulierung der Ribonucleotidreduktase in vivo

Mehrere Studien in Bakterien, Hefe und tierischem Gewebe legen eine Funktion von Thymidin oder einem Thymidinderivat als Repressor oder Corepressor der Ribonucleotidreduktase nahe [71]. 1965 wiesen Biswas und Beck eine 10-12 fache Enzymaktivitätssteigerung in einer thyminbedürftigen E. coli Mutante (E. $coli_{15T}$-) nach, wenn sie bei Thyminmangelbedingungen kultiviert wird [72]. Ein Thymidylatmangel kann auch künstlich durch Hemmung des Wildtyps E. coli B mit dem Thyminanalogen 5-Fluoruracil bewirkt werden. 5-Fluoruracil wird von der Zelle aufgenommen, ribosyliert und kann via Thymidinkinase und Ribonucleotidreduktase zum 5-FdUMP umgewandelt werden, das als starker Inhibitor der Thymidylatsynthetase (EC 2.1.1.45) wirkt. Neben diesem Hauptweg können noch weitere anabole Sequenzen beschritten werden, die zum 5-FdUMP führen [73]. Durch Hemmung der Thymidylatsynthetase sinkt der dTTP-Pool, und die DNA-Synthese kommt zum Erliegen. Der Effekt ist lange bekannt und wird ausgenutzt, um radioaktiv markiertes Thymidin mit hoher spezifischer Radioaktivität in DNA einzubauen. Diese Blockade der DNA-Synthese mittels 5-FUra induziert neben einer intensiven Proteinbiosynthese auch die 5-10 fache, chloramphenicolsensitive Erhöhung der Ribonucleotidreduktaseaktivität [72]. Die Beobachtungen bilden den Ausgangspunkt von Experimenten und Spekulationen über die Regulation der DNA-Synthese, die im Einzelnen noch diskuiert werden sollen.

Der pragmatische Gesichtspunkt des Befundes liegt auf der Hand: Durch spezifische Hemmung der Thymidinneusynthese eine Steigerung der geringen Ribonucleotidreduktaseaktivität zu bewirken. Der Thymidinstoffwechsel scheint neben der allosterischen Beeinflußung der Ribonucleotidreduktase noch über eine weitere regulatorische Funktion in Eukaryonten und Prokaryonten zu verfügen, die unabhängig vom Typ der Ribonucleotidreduktase (Typ I oder II) verbreitet ist. So bestand berechtigte Hoffnung, auch in Grünalgen den gleichen Effekt zu beobachten.

Thyminmangelmutanten wurden in eukaryontischen Grünalgen zwar intensiv gesucht, bislang jedoch ohne Erfolg [74], so daß dieser elegante Weg - wie in E. coli - nicht gangbar ist. Die andere Möglichkeit, nämlich die Hemmung der DNA-Synthese durch 5-Fluor-Uracil, setzt dessen Aufnahme und Umbau zum dTMP-Analogen in der Zelle voraus. Fehlt eines der zur Synthese von 5-FdUMP benötigten Enzyme, ist die Zelle gegenüber einer Hemmung mit 5-FUracil insensitiv [75]. Es muß betont werden, daß die Hemmung der Thymidylatsynthetase zwar der bei weitem bedeutendste Effekt, jedoch nicht der einzige Wirkungsort im Metabolismus ist. So wird 5-FUracil in RNA eingebaut und bewirkt auch dort funktionelle Veränderungen.

Zu synchronisierten Scenedesmuskulturen wird zur 9. h des Zellzyklus 5-FUracil (Serva, 40 µg/ml = 0,30 mM) gegeben und zeitabhängig der weitere Verlauf der Ribonucleotidreduktase im Zellzyklus bestimmt, indem die Zellen (gleiche Zellzahl!) zu definierten Zeiten geerntet und aufgebrochen werden. Man dialysiert gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6, 1 mM DTT und testet den Rohextrakt. Abb. 7 zeigt die Wirkung des 5-FUracil auf die Ribonucleotidreduktaseaktivität (■) nach Hemmung und der unbehandelten Kontrolle (▲).

Die Ribonucleotidreduktase-Aktivität steigt weit über die S-Phase der Kontrolle auf den doppelten Wert der nichtstimulierten Algen an. Unter der Annahme, daß 5-FdUMP der in vivo hemmende Metabolit ist, erwartet man einen stärkeren Effekt mit 5-Fluordesoxyuridin (5-FdUrd), das in der Zelle als unmittelbarer Vorläufer zum 5-FdUMP phosphoryliert wird und rasch eine hohe stationäre Konzentration des Nucleotids erreicht.

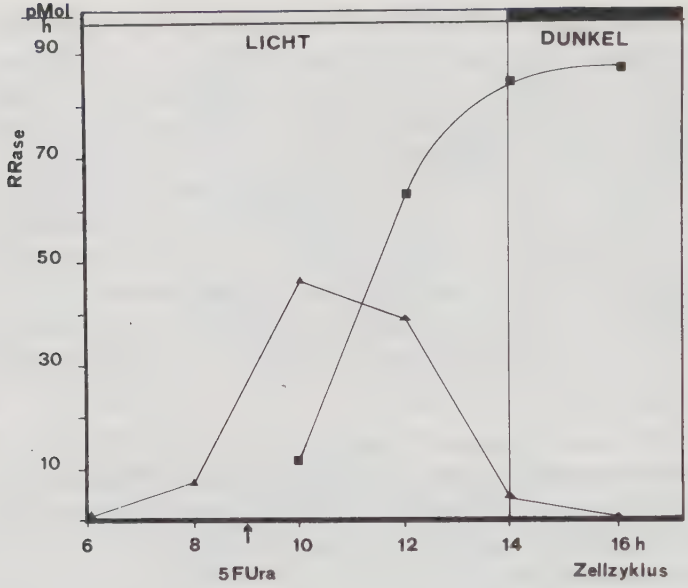


Abb. 7: Ribonucleotidreduktaseaktivität ($\frac{pMol}{h}$) während des Zellzyklus mit (■) 40 µg/ml 5-FUra im Kulturmedium zur 9. Stunde
(▲) Kontrolle ohne 5-FUra

In einem weiteren Experiment wird deshalb 5-FdUrd (10 µg/ml = 215 µM) in der 9. Stunde des Zellzyklus zur Algenkultur gegeben und der Verlauf der Ribonucleotidreduktase mit je gleichen Algenmengen bestimmt (Abb. 8 (▲)).

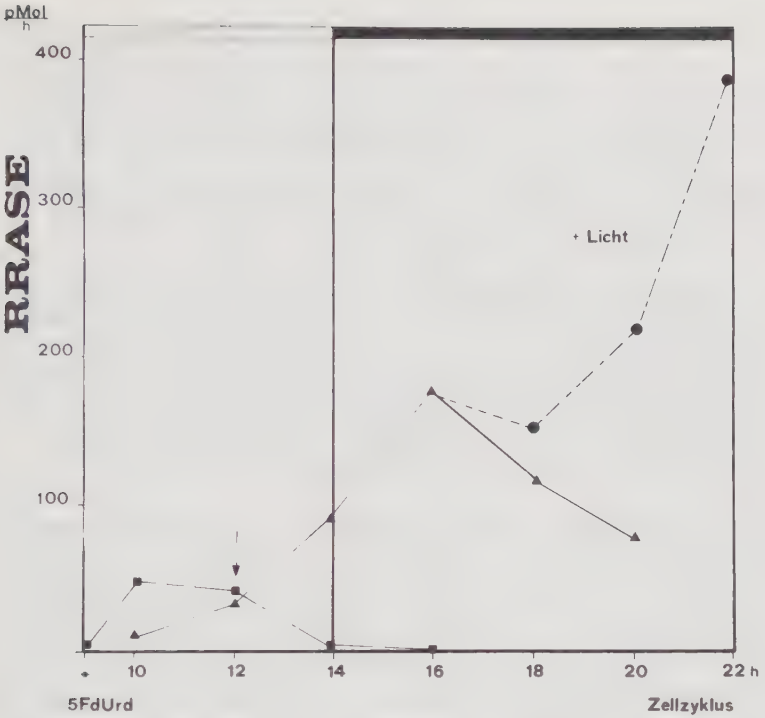


Abb. 8: Ribonucleotidreduktase-Aktivität ($\frac{pMol}{h}$) während des Zellzyklus mit a): 10 µg/ml 5-FdUrd im Kulturmedium zur 9. Stunde (▲)
b): wie a) jedoch ab der 14. Stunde + Licht (●)
c): Enzymaktivität ohne 5-FdUrd (■)

Wie schon im letzten Experiment steigt auch hier die Enzymaktivität über die S-Phase hinaus bis zur 16. Stunde an, um dann jedoch innerhalb von 4 Stunden auf etwa die Hälfte des Maximalwertes zurückzugehen. Die maximale Aktivität der stimulierten Zellen erreicht zur 16. Stunde etwa das Vierfache der nicht-stimulierten Zellen zur 12. Stunde (→). Unklar bleibt zunächst das Absinken der Ribonucleotidreduktase-Aktivität nach der

16. Stunde des Zellzyklus.

Dieses Absinken der Enzymaktivität kann überraschenderweise völlig verhindert werden wenn nicht, wie zur Synchronisation üblich, zu Beginn der 14. Stunde die Beleuchtung der Algenkultur gelöscht, sondern die Lichtphase über die 14. Stunde hinaus beibehalten wird. Das Ergebnis dieses Versuchs ist ebenfalls in Abb. 8 (●) dargestellt.

Die Ribonucleotidreduktaseaktivität steigt dabei auch nach der 16. Stunde weiter stark an. Sie beträgt in der 22. Stunde des Zellzyklus etwa das neunfache der Enzymaktivität, die maximal während der S-Phase in nichtstimulierten Zellen gefunden wird und erreicht gar das 75-fache einer homokontinuierlichen Scenedesmus-Kultur gleicher Zelldichte [15].

Dieser bedeutende stimulierende Effekt, die "Anreicherung" der Ribonucleotidreduktase in vivo, wird durch sinnvolle Kombination von Synchronisation der Zellen, Stimulation durch 5-FdUrd und die Verlängerung der Lichtphase erzielt. Er erlaubt, schon im Rohextrakt genügend Enzymaktivität zu messen und schafft günstige Voraussetzungen - trotz der Instabilität des Enzyms in vitro - durch geeignete Vorgangsweise zu einer befriedigenden Reinigung zu gelangen.

Bei nahezu allen folgenden Untersuchungen werden deshalb auch 5-FUra- oder 5-FdUrd-stimulierte Algen eingesetzt. Weitergehende Untersuchungen des Effektes werden später nochmals aufgegriffen und im Einzelnen diskutiert.

3.2 Optimierung analytischer Methoden zur Trennung von Nucleosiden und Nucleotiden

3.2.1 Ribonucleotidreduktase-Aktivität: Test und Auswertung

Ribonucleotidreduktase-Aktivität kann unterschiedlich getestet werden [1]. Kontinuierliche Registrierung der Enzymaktivität gelingt im optischen Test, der im gekoppelten System mit NADPH, Thioredoxinreduktase, Thioredoxin und Ribonucleotidreduktase den Verbrauch an NADPH mißt, dessen Wasserstoff auf das Ribonucleotid übertragen wird. Voraussetzung ist die Verfügbarkeit aller Komponenten in genügender Menge und gereinigter Form, was bisher nur bei Ribonucleotidreduktase aus E. coli, T4-Phagen und L. leichmannii möglich ist. Alle anderen Testvarianten sind diskontinuierlich. Ein theoretisch gangbares, jedoch wegen der geringen Empfindlichkeit nicht praktiziertes Verfahren baut das Desoxyribonucleosid durch saure Hydrolyse zur 2'-Desoxyribose ab und weist diese durch geeignete kolorimetrische Methoden nach [77].

Die meisten Testsysteme verwenden den sehr empfindlichen radiochemischen Assay. Die universell anwendbare, von Reichard eingeführte Verfahrensweise setzt radioaktiv markiertes Substrat ein, das nach der enzymatischen Reaktion einheitlich entweder säurehydrolytisch zum Nucleosidmonophosphat oder enzymatisch zum Nucleosid abgebaut wird. Der Anteil des Desoxyribonucleotids wird nach Substrat-Produkttrennung durch Radioaktivitätsmessung bestimmt. Die Methodik der Substrat-Produkttrennung ist Gegenstand vieler Publikationen und bildet mittlerweile eine eigene Domäne der Ribonucleotidreduktaseforschung [1,46].

Die Substitution der 2'-OH-Gruppe des Riboserestes durch Wasserstoff bei der Ribonucleotidreduktion bewirkt nur eine sehr geringe Veränderung der chemischen Struktur und damit der Eigenschaften eines Nucleotids. Der an sich geringe Ladungsunterschied wird durch die Bildung von Boratkomplexen mit der cis-Diolstruktur der Ribose vergrößert, indem die negative Ladung um 1 steigt während die entsprechende 2'-Desoxyverbindung diesen Komplex nicht bilden kann. Deshalb nutzt die Mehrzahl der zur Substrat-Produkttrennung verwendeten Methoden nach dem Prinzip der Ionenaustausch-, Ionenausschluß-, Verteilungs- und Affinitätschroma-

tographie diesen Effekt aus. Die Vielfalt der Verfahren wird noch dadurch vergrößert, daß sich die Nettoladung der Nucleotide und Nucleoside pH-abhängig ändert und zur Trennung sowohl Kationen-als auch Anionenaustauscher verwendet werden können.

Die Wahl der richtigen Trennmethode ist von weitreichender Bedeutung, denn sie ist der zeitlich limitierende Faktor des zeitaufwendigen Ribonucleotidreduktasetests.

Notwendige Voraussetzung zur Auswertung eines Ribonucleotidreduktasetests ist die Güte der Trennung, d. h. ein genügend großer Unterschied der R_f-Werte bzw. der Elutionszeiten, zumal oft geringe Produktmengen neben viel Substrat nachgewiesen werden müssen. Die gegenläufigen Erfordernisse von Trenngüte und kurzer Trennzeit bzw. stark unterschiedlichen Mengen chemisch ähnlicher Nucleotide kennzeichnet die grundsätzliche Schwierigkeit der Trennverfahren.

Hinzu kommt, daß nicht nur die Trennung, sondern auch der quantitative Nachweis der getrennten Substanzen schwierig sein kann, wenn papier- oder dünnschichtchromatographische Methoden verwendet werden. Die Zählausbeute der Messung mit einem Dünnschicht oder Papierscanner beträgt für Tritium ca. 2 % gegenüber der Flüssigkeitsszintillationszählung mit ca. 35 % [48].

Die untere Nachweisgrenze liegt demnach für DC- und Papierchromatographische Methoden um etwa den Faktor 15-20 höher, ganz abgesehen von dem verschieden großen Meßfehler, der bei der Szintillationszählung durch die Wahl der Meßzeit kontrolliert werden kann. Abkratzen der Dünnschichtmaterialien oder Ausschneiden des Papiers, Extraktion und anschließende Szintillationsmessung ist problematisch [48], so daß man im allgemeinen säulenchromatographische Methoden bevorzugt. Bei genügend großen Enzymaktivitäten ist Dünnschichtchromatographie jedoch die Methode der Wahl, da gleichzeitig mehrere Proben getrennt werden und - besonders bei Anwendung von PEI-Cellulose - sehr scharfe, rasche (1-6 Stunden) Trennungen erzielt werden [60]. Zeitlich limitierend ist dann die Radioaktivitätsmessung mit dem Dünnschichtscanner (Zeitbedarf: 3 Stunden pro Test).

Sollte im Rahmen dieser Arbeit RRase aus Scenedesmus eingehend charakterisiert und gereinigt werden, so konnte das nur mit für jede Stufe optimierten und raschen Bestimmungsverfahren gelingen. Das Prinzip dieser Verfahren ist im folgenden beschrieben, soweit Modifizierungen und Neuentwicklungen erforderlich waren.

3.2.2 Trennung von Nucleotiden und Nucleosiden auf PEI-Cellulose

Bei einigen Ribonucleotidreduktasetests mit Rohhomogenaten wurde die Substrat-Produkttrennung auf Polyethylenimincellulose-beschichteten Dünnschichtplatten mit dem borathaltigen Laufmittel nach Schrecker [51], wie in 2.3.4 beschrieben, durchgeführt.

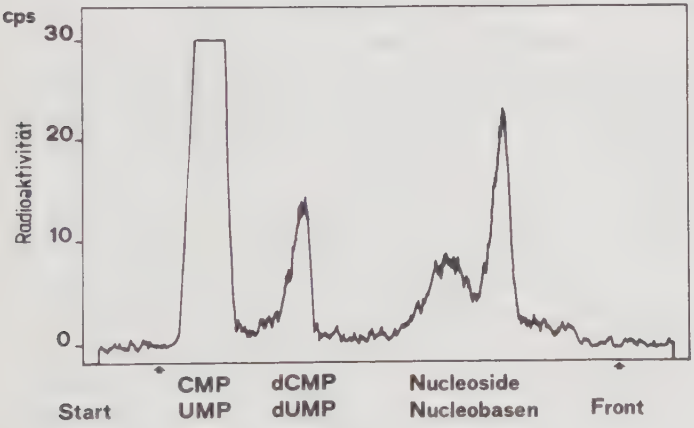


Abb. 9 Radioaktivitätsverteilung eines Testgemisches auf PEI-Cellulose nach Schrecker. Trennung der Nucleosidmonophosphate

Abb. 9 zeigt die Radioaktivitätsverteilung der getrennten Nucleotide CMP, dCMP und bei den größten R_f-Werten nicht aufgelöst Cytidin, Uridin sowie Cytosin und Uracil. Das Diagramm weist eine ausreichende Trennung von CMP und dCMP auf, zeigt jedoch, daß Desoxycytidin nicht zu erfassen ist, da die Nucleoside und Nucleobasen nicht aufgetrennt werden.

Dies gilt für alle Verfahren, die auf der Stufe des Nucleosidmonophosphats trennen; besonders dann, wenn nur wenig angereicherte Enzympräparationen eingesetzt werden. Die Nucleosidbildung läßt sich zwar mit Fluorid zurückdrängen, doch die Summe der Nachteile, nämlich schlechte Auswertbarkeit bei geringer Ribonucleotidreduktase-Aktivität von weniger als 2,5 % Umsatz, Nichtberücksichtigen des Anteils der Nucleoside sowie der Zeitbedarf der Auswertung ließen es ratsam erscheinen, als Routineverfahren säulenchromatographische Trennverfahren auf der Stufe der Nucleoside zu erproben.

Während PEI-Cellulose für die eigentliche Ribonucleotidreduktase-Analytik der Säulenchromatographie unterlegen ist, ist sie zur Trennung von Nucleotiden verschiedener Phosphorylierungsstufen gut anwendbar.

Zur Bewertung eines Reinigungsschrittes muß neben der Ribonucleotidreduktase-Aktivität stets auch das Ausmaß der störenden Enzymaktivitäten bekannt sein. Eine extreme Situation liegt im Rohhomogenat vor, in dem ein sehr schneller Umbau des Substrats CDP zu 75 % CTP in weniger als 2 Minuten katalysiert wird. Andererseits mißt man sogar in hochgereinigten Enzympräparationen des Enzyms aus E. coli noch Nucleosiddiphosphatkinase-Aktivitäten[78] Dies zeigt umso mehr die Notwendigkeit, Phosphorylierung und Dephosphorylierung des radioaktiven Substrates und Produktes zu analysieren. Änderungen der Phosphorylierungsstufe von Nucleotiden sind leicht zu messen, da sich die Ladung des Moleküls stark ändert. Es liegt nahe, eine dünnschichtchromatographische Methode anzuwenden, um gleichzeitig mehrere Proben rasch aufzutrennen, zumal nur große (d. h. gut meßbare) Verschiebungen des Nucleotidmusters von Bedeutung sind (> 5 %), die einen wesentlichen Einfluß auf die Ribonucleotidreduktase-Aktivität nehmen.

Zur Trennung unterschiedlich phosphorylierter Nucleotide auf PEI-Platten sind verschiedene Laufmittelsysteme publiziert, die jedoch Desoxyribo- und Ribonucleotide nicht differenzieren und somit nur teilweise den gestellten Anforderungen genügen. Beck et al. [61] beschreiben dagegen ein borathaltiges Laufmittelsystem, das gleichzeitig Ribo- und Desoxyribonucleotide aller

Phosphorylierungsstufen differenziert. So wird ermöglicht, auch bei Umsätzen der Ribonucleotidreduktase von wenigstens 5 % in dem Produktgemisch zu Aussagen über die Substrat und Produktverteilung zu kommen.

Das publizierte Laufmittelsystem besteht aus drei Einzellaufmitteln. Nach dem Auftragen der Proben badet man die PEI-Platten zunächst in absolut wasserfreiem Methanol, trocknet und entwickelt in Laufmittel I (abs. Methanol) und erst darauf folgend in Laufmittel II und III.

Methanol löst sowohl störendes Salz als auch Nucleoside aus der PEI-Celluloseschicht, während die stark negativ geladenen Nucleotide auf der Startlinie fest gebunden bleiben (Ausbeute: 90 %). Die Vorschrift wurde - wie in 2.9 beschrieben - verändert und jegliche Methanolbehandlung vermieden, da auch der Anteil an Nucleosid bestimmt werden soll. Abbildung 10 zeigt die Trennung eines Testgemisches nach 60 Minuten Inkubation mit einer Ribonucleotidreduktasepräparation. Die Aufzeichnung der Radioaktivitätsverteilung und Integration erfolgt am Berthold-Dünnschichtscanner.

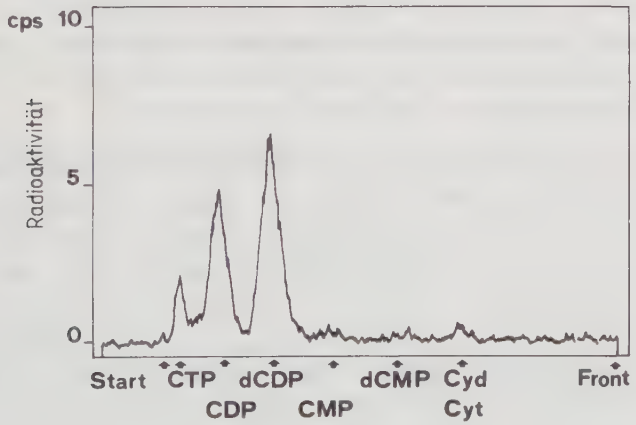


Abb. 10: Radioaktivitätsverteilung nach der Trennung der Ribo- und Desoxyribonucleotide eines Ribonucleotidreduktase-Tests auf PEI-Cellulose

Rf-Werte können nicht angegeben werden, da sich die gleiche Trenngüte nicht immer reproduzieren läßt, obwohl die Reihenfolge der aufgetrennten Nucleotide stets erhalten bleibt. Die Zuordnung erfolgt deshalb durch Vergleich mit chromatographierten Vergleichssubstanzen. Das Laufmittelsystem läßt sich ebenso für die Bestimmung aller Uridinnucleotide verwenden. Die Differenzierung beider Pyrimidinribo- und Desoxyribonucleotide ist jedoch wegen der Überlappung einzelner Wanderungsstrecken nicht möglich.

3.2.3 Enzymatischer Abbau zum Nucleosid

Trennverfahren auf der Stufe der Nucleoside sind vorteilhaft, weil sie alle gebildeten Desoxyribonucleotide und Desoxyribonucleoside erfassen, die durch enzymatisch katalysierten Phosphatabbau der Nucleotide im Testgemisch entstehen.

Besonders Purinnucleotide als Substrate der Ribonucleotidreduktase können wegen der säurelabilen N-glykosidischen Bindung nicht mit Säure zum Nucleosidmonophosphat hydrolysiert werden, sondern man baut sie enzymatisch zum Nucleosid ab. Die Bildung der Nucleoside erfolgt mit 4 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm in 45 Minuten. Abbildung 11 zeigt beispielhaft die zeitliche Veränderung von CDP, CMP und Nucleosid.

Bemerkenswert ist der enzymatisch katalysierte rasche Abbau des CDP, während CMP nur langsam hydrolisiert. Der pH-Wert von pH 7,8 liegt weit ab von dem pH-Optimum (pH 10,5) der alkalische Phosphatase, so daß nur geringe Umsätze - gemessen an der eingesetzten Enzymaktivität - gefunden werden. Man verlängert daher die Inkubationszeit zur Sicherheit auf 90 Minuten. Ähnliche Versuche mit Nucleotid-Pyrophosphatase (Apyrase, EC 3.6.1.9) sowie die Kombination mit alkalischer Phosphatase unter verschiedenen Bedingungen (30°C, 37°C, pH 6,0; pH 7,0; pH 8,0) erbrachten keine Vorteile. Die Verwendung der alkalischen Phosphatase erweist sich deshalb als besonders vorteilhaft,

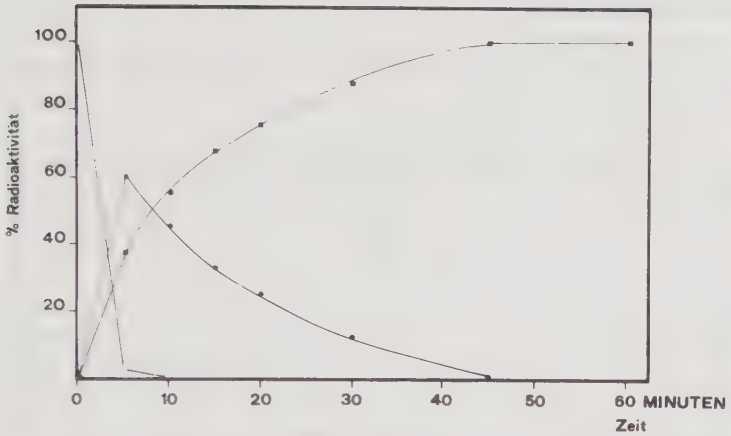


Abb. 11: Kinetik des Abbaus der Testmischung mit 4 U alkalischer Phosphatase zum Nucleosid; 37°C; pH 7,8
Auswertung mit PEI-Cellulose; Laufmittel siehe 2.9
(○) CDP
(●) CMP
(■) Cyd

weil in der hochgereinigten Enzympräparation keine störenden Enzymaktivitäten (Desaminasen, N-Glycosidasen) enthalten sind.

3.2.4 Trennung der Nucleoside auf Dowex 1x8-Borat

1970 publizierten Steeper und Steuart [50] eine Methode zur Auswertung der Ribonucleotidreduktasetests, die auf folgendem Prinzip beruht: Auf einen Anionenaustauscher (Dowex 1x8; 200-400 mesh) in der Boratform wird das zu trennende Nucleosidgemisch aufgetragen und mit Wasser nachgewaschen, wobei Desoxycytidin von der Säule eluiert wird. Cytidin bleibt auf dem Austauscherherz als Boratkomplex ionisch gebunden. Man löst Cytidin mit einer gesättigten Boratlösung von der Säule und bestimmt die Radioaktivität beider Fraktionen. Das Verfahren erfordert keinen apparativen Aufwand, da Pasteurpipetten als Säulen verwendet werden. Außerdem lassen sich mehrere Trennungen gleichzeitig durchführen. Die verlockende Möglichkeit, neben-

einander viele Assays zu trennen und auszuwerten, führte zur eigenen Erprobung.

Abb. 12 zeigt die Radioaktivitätsverteilung einer derart durchgeführten Trennung.

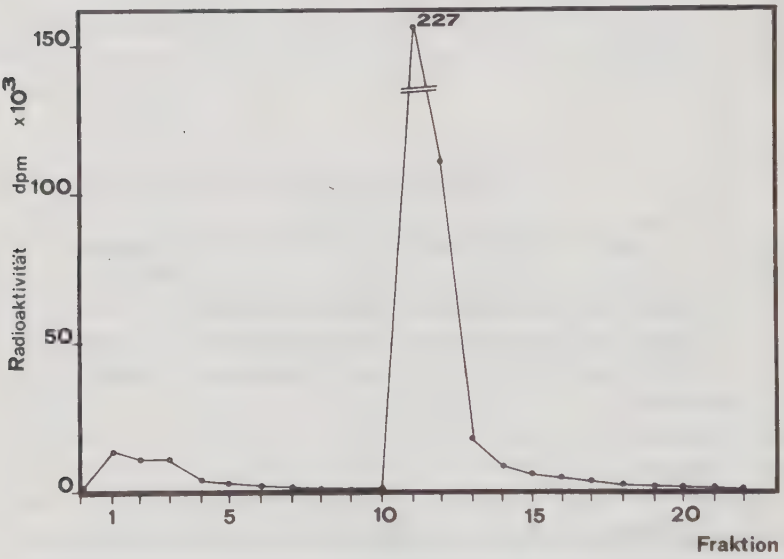


Abb. 12: Radioaktivitätsverteilung eines getrennten Testgemisches auf Dowex 1x8 (200-400 mesh) in der Boratform
Trennung als Nucleoside
Säule: 0,5 x 7,0 cm
Elutionsgeschwindigkeit: 15 ml/h
1 Fraktion: 0,5 ml

Die auf den ersten Blick elegante und vorteilhaft erscheinende Methode erwies sich jedoch in verschiedener Hinsicht als problematisch und mußte schließlich aufgegeben werden.
Die Trenngüte ist zwar überraschend gut, da der Zeitpunkt, mit der das Ribonucleosid durch Borat eluiert wird, nahezu beliebig gewählt werden kann. Die zur Elution des Cytidins verwendete gesättigte, stark alkalische Boratlösung bewirkt jedoch Lumineszenzerscheinungen im Szintillationscocktail,

der zunächst über Nacht gelagert wird, bevor die Probe zur Messung gelangt. Ferner hat die Durchbruchsfraktion (mit ^{3}H-Desoxycytidin) eine stark abweichende Zusammensetzung von dem Eluat mit Cytidin in konzentrierter Boratlösung. Der hohe Salzgehalt führt zur Ausfällung von festem Borat in den Zählgläschen, so daß inhomogene Proben sehr unterschiedlicher Zählausbeute entstehen und die gemessene Radioaktivität nicht unmittelbar vergleichbar ist. Beispielsweise sinkt die Zahl der Impulse von 149 000 cpm in wässriger Lösung auf 63 000 cpm in borathaltigem Medium. Fortschritte erbrachte die Berechnung der absoluten Radioaktivität durch Anwendung der "double ratio technique" und ein Wechsel zu einem Szintillationsgemisch mit Szintisol GP (Isolab) als Lösungsvermittler [49]. Es zeigte sich jedoch, daß der Gehalt des Desoxycytidins stets bei etwa 8 % der Gesamtradioaktivität lag, während durch säulenchromatographische Trennung [15] ein Gehalt von 0,4-0,5 % ermittelt wurde. Der hohe Blindwert wird durch $^{3}H_2O$ und andere nicht näher untersuchte Verunreinigungen verursacht. Nach Absublimieren einer Probe im Vakuum stellt sich z. B. heraus, daß sie einen Gehalt von 49,8 % $^{3}H_2O$ in den Fraktionen 1-5 (Abb. 12) enthielt.

Da die $^{3}H_2O$-Bildung, die durch basenkatalysierten Isotopenaustausch auf der Säule zustandekommt, nicht reproduzierbar ist und bei 8 $\pm$ 3 % schwankt, scheidet diese Trennmethode aus. Die Verwendung ^{14}C-markierten CDP als Substrat scheitert an dessen zu niedriger spezifischer Radioaktivität und aus Kostengründen.

3.2.5 Trennung der Nucleoside durch Mitteldruckchromatographie

Eine Kombination von Ionenausschlußchromatographie und Boratkomplexierung der Ribonucleoside beschreiben Pal und Mitarbeiter in einer 1975 publizierten Arbeit [46]. Pyrimidin- oder Purinnucleoside können durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) in 60 Minuten getrennt werden. Das sehr schnelle Verfahren weist einen weiteren entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Systemen auf, in dem das Harz nicht nach jeder Trennung regeneriert werden muß, sondern zeitsparend die kontinuierlich hintereinander folgende Analyse vieler Proben ermöglicht. Durch die Auftrennung aller Nucleoside und Basen kann neben Ribo-

nucleotidreduktase-Aktivität gleichzeitig der Anteil anderer Enzymaktivitäten (Desaminierung oder Spaltung der N-Glykosidischen Bindung) mit erfaßt werden.

Die Sulfonsäuregruppe des Kationenaustauschers sind in 0,1 N Boratpuffer pH 7,3-7,4 vollständig ionisiert. Im Gegensatz zur Ionenaustauschchromatographie werden die Nucleoside nicht entsprechend ihrer Ladung verschieden fest gebunden, sondern sehen sich einer unterschiedlich starken Abstoßung gegenüber, die im wesentlichen die Reihenfolge der getrennten Substanzen bestimmt; die am stärksten negativ geladenen Nucleoside werden zuerst eluiert [80]. So erwartet man beispielsweise bei der Trennung von Cytidin und Desoxycytidin zuerst Cytidin, das aufgrund des gebildeten Boratkomplexes eine um 1 negativere Ladung trägt. Diese Methode haben wir mit bestem Erfolg für einen Beckman-Multichrom-Aminosäureanalysator mit dem Kationenaustauscherharz M 71 adaptiert.

Durch Variation der Trennparameter pH-Wert der Boratpuffer, Ionenstärke, Säulentemperatur und Durchflußgeschwindigkeit wurde die Trennung optimiert. Im Gegensatz zu dem publizierten Verfahren ist die Anwendung eines diskontinuierlichen pH-Wechsel vorteilhaft, wobei zusätzlich der günstigste Zeitpunkt des Pufferwechsels bestimmt werden muß. Ribonucleotidreduktase aus Scenedesmus wird mit CDP als Substrat getestet. Vorrangig muß deshalb Desoxycytidin von allen anderen Komponenten möglichst gut abgetrennt werden.

An dem umgerüsteten Aminosäureanalysator können Zeitpunkt der Probeneingabe und des Pufferwechsels vorgewählt werden, so daß der gesamte Analysenablauf automatisch erfolgt. Ein Probengeber nimmt bis zu 30 Proben auf, die nacheinander aufgetrennt werden.

Das Elutionsdiagramm einer Trennung von Cytidinnucleosiden und Cytosin (Cyd, dCyd, Cyt) zeigt Abbildung 13. Aufgezeichnet ist die Extinktion bei 270 nm in Abhängigkeit von der Elutionszeit.

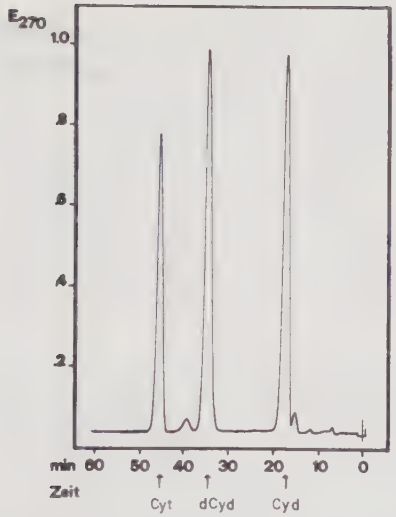


Abb. 13: Trennung von Cyd, dCyd und Cyt auf Beckman Harz M 71
Elution mit 0,1 M Ammoniumborat
0 - 16 Minuten: Puffer I pH 7,3
16 - 40 Minuten: Puffer II pH 8,0
40 - 60 Minuten: Puffer III pH 7,3

Durchfluß: 1 ml/Minute

Vorteilhaft wirkt sich die schrittweise Änderung des pH-Wertes aus. Er führt zu einer wesentlichen Verkürzung der Analysenzeit und vermindert drastisch das Elutionsvolumen der Cytidinderivate. Um den günstigen Einfluß zu demonstrieren, ist in Abbildung 14 eine Trennung ohne Verwendung des diskontinuierlichen pH-Gradienten aufgezeichnet. So wird Cytosin erst nach 105 Minuten eluiert, während bei Verwendung des Gradienten nur 46 Minuten benötigt werden.

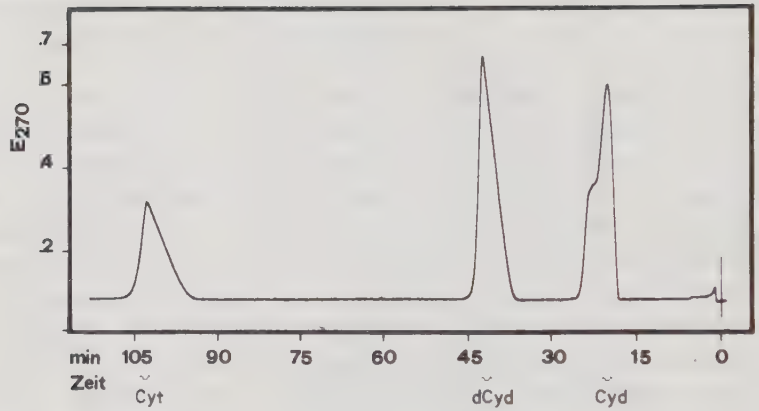


Abb. 14: Trennung von Cyd, dCyd und Cyt
Elution mit Puffer I
Durchfluß: 1 ml/Minute

Die Uridinderivate werden unter diesen Bedingungen nicht vollständig aufgelöst. Dies gelingt jedoch leicht, wenn die Durchflußgeschwindigkeit von 60 ml/l auf wenigstens 50 ml/l verringert wird (Abb. 15).

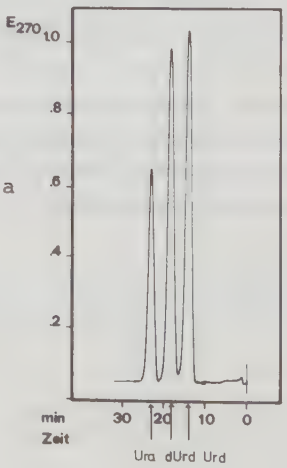


Abb. 15:
Trennung von Urd, dUrd und Ura
Elution mit Puffer I
Durchfluß: 0,83 ml/Minute

Die Elutionsvolumina werden in sehr empfindlicher Weise von dem pH-Wert des Puffers beeinflußt, da er die Ladung der Base bestimmt, die Gleichgewichtslage im Alkalischen zugunsten der Boratkomplexierung verschiebt und scharfe Peaks geringer Halbwertsbreite resultieren. Bei pH-Wert-Erhöhung werden alle Nucleoside und Basen früher eluiert. Ferner ist die Wirkung auf die Ribonucleoside so groß, daß Uracil und Desoxyuridin von Cytidin überholt werden und sich die Reihenfolge der getrennten Komponenten verändert (Urd, Cyd, dUrd, Ura, dCyd, Cyt).

Die Auftrennung der Adenin und Guaninnucleoside gelingt in gleicher Weise ohne Veränderung der Bedingungen im Gegensatz zur publizierten Vorschrift. Abbildung 16 zeigt das Elutionsprofil von Guanosin, Desoxyguanosin und Guanin. Zur Trennung der Adeninderivate siehe auch: 3.4.2.

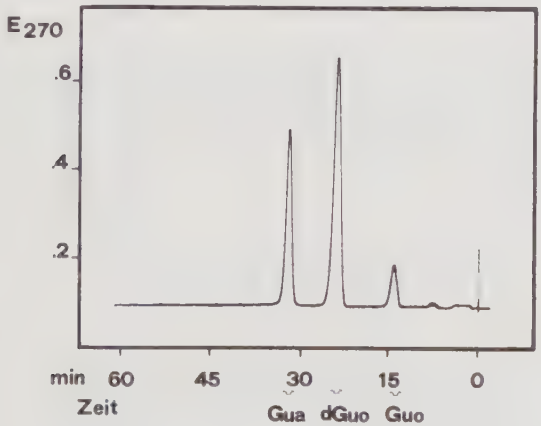


Abb. 16: Trennung von Guo, dGuo und Gua
Elution mit Puffer I-III
Durchfluß: 1 ml/Minute

Die Anwendung von zwei Puffern (I,II) erfordert zwar Äquilibrierung der Säule mit Puffer I, pH 7,3 (20 Minuten), bevor die nächste Probe aufgegeben werden kann. Diese Maßnahme ist

trotzdem zweckmäßig, da sie eine wesentliche Verkürzung der Analysenzeit bewirkt. Zusätzlich wird auf diese Weise eine Bandenverbreiterung verhindert, die sich mit steigender Analysenzeit durch Diffusion zunehmend auswirkt, indem die Banden "fokussiert" werden.

Die so entwickelte Methodik stellt eine Fortentwicklung des von Pal und Hamilton publizierten Verfahrens dar, da der Betrieb des Analysators automatisch erfolgt. Die Elution der getrennten Komponenten geschieht blockweise; zunächst werden alle Uridin und erst dann alle Cytidinderivate jeweils in der Reihenfolge Ribonucleosid, Desoxyribonucleosid und Base eluiert. Bei den gewählten Bedingungen (pH 7,3-8,0; 55°C) sind die Nucleoside sowie deren radioaktive Markierung stabil, so daß mit einer Bildung von tritiiertem Wasser nicht gerechnet werden muß.

Den direkten Vergleich der Radioaktivitätsverteilung und der gleichzeitig registrierten Extinktion der Trennung eines Ribonucleotidreduktasetests (mit CDP als Substrat) zeigt Abbildung 17.

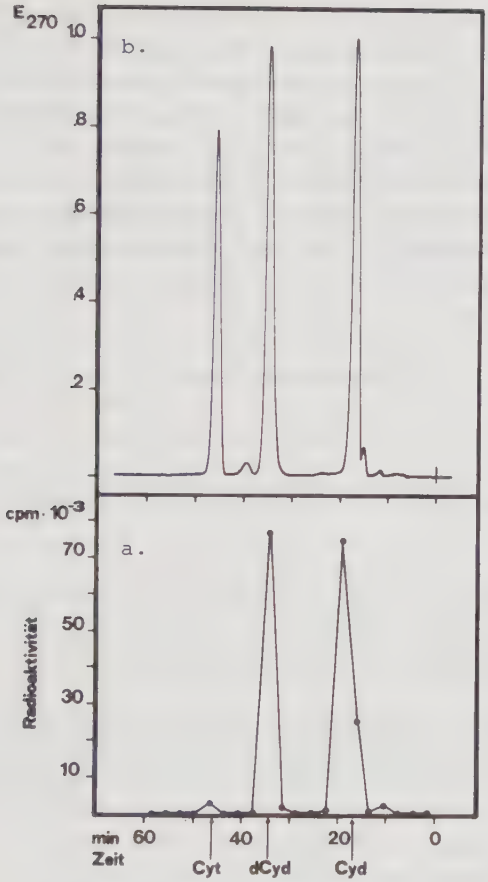


Abb. 17: Trennung des Nucleosidgemisches eines mit alkal. Phosphatase abgebauten Ribonucleotidreduktasetests. Elution mit 0,1 M Ammoniumborat-Puffer I-III
Extinktionsaufzeichnung
a) Radioaktivitätsverteilung
b) Extinktionsaufzeichnung
Fraktionsgröβe: 3 ml
Durchfluβ: 1 ml/Minute

Je Trennung werden 20 Fraktionen a 3 Minuten gebildet, deren Radioaktivität (1 ml) gemessen wird. Zur quantitativen Auswertung entnimmt man jeweils zusammengehörenden Fraktionen aliquote Teile (200 µl) und bestimmt die Radioaktivität (dpm) der so gebildeten Pools (Cyd, dCyd, Cyt). Beide Profile stimmen überein und die Radioaktivitätsverteilung zeigt neben Cytidin und Desoxycytidin (42 % Umsatz) nur geringe Mengen Cytosin (2 %), das in dieser Menge schon als Verunreinigung in käuflichem [5-^{3}H]CDP enthalten ist. Eine Uridinbildung wird hier nicht registriert.

Die Auswertung von Ribonucleotidreduktase-Tests mit sehr geringer Aktivität wird erleichtert, da Probenvolumina bis zu 150 µl aufgetragen werden können. Es gelingt noch Unterschiede von 0,3 % Umsatz entsprechend 1,5 pMol reproduzierbar nachzuweisen, während Schwankungen unter 0,3 % Umsatz nicht interpretierbar sind.

Die Reproduzierbarkeit der Analyse eines Ribonucleotidreduktasetests wurde durch 4-fache Bestimmung abgeschätzt, indem je 100 µl Probenvolumen zur Trennung eingesetzt werden.

Tabelle 4: Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Ribonucleotidreduktase-Aktivität bei 4-maliger Trennung eines Assays

Messung	% dC	pMol
1	7,66	38,30
2	7,67	38,35
3	7,61	38,05
4	8,08	40,40

Die vierte Messung kann nach allen Erfahrungen als "Ausreißer" betrachtet werden. Zusätzlich muß betont werden, daß die Abweichungen durch unabhängige Fehler von Trennung, Probenentnahme und Radioaktivitätsmessung zustande kommen. Der Mittelwert beträgt 7,76 $\pm$ 0,3 % Umsatz, entsprechend einem Resultat und prozentualem Fehler von 38,78 pMol $\pm$ 4 %.

Ohne apparativen Aufwand läßt sich die beschriebene Ionenausschlußchromatographie mit nur einem Puffer (0,1 M Ammoniumborat pH 6,9) auf konventionellen Austauscherharzen (Dowex 50 WX2, 200-400 mesh) übertragen. Die Säule (0,9 x 25 cm) kann bei 25°C mit einer Peristaltikpumpe betrieben werden. Man erreicht die Abtrennung des Desoxycytidins einerseits von Uridinderivaten und Cytidin als einen nicht aufgelösten Block und andererseits von Cytosin in etwa 3 Stunden. Diese Methode ist zeitlich durchaus konkurrenzfähig mit der ursprünglich von Reichard beschriebenen Chromatographie der Nucleosidmonophosphate in 0,1 N Essigsäure, die mehr als 24 Stunden für eine Trennung benötigt [79].

3.3 Reinigung der Ribonucleotidreduktase

Die Enzymreinigung von Ribonucleotidreduktase aus Scenedesmus mußte sich sinnvollerweise zuerst an Vorgangsweisen für andere Reduktasen des Typs I orientieren. Die Hemmbarkeit durch Hydroxyharnstoff, die geringe Stabilität oder - soweit bekannt - der Aufbau des Enzyms in Eukaryonten aus mindestens 2 Untereinheiten stellen zwar generelle Gemeinsamkeiten dar, können jedoch über starke Unterschiede im Detail nicht hinwegtäuschen. So scheint die Algen-Ribonucleotidreduktase dem Enzym aus tierischen Zellen hinsichtlich ihres pH-Optimums nahezukommen, während die Salzempfindlichkeit bei Hefe gefunden wurde. Dagegen akzeptiert das Enzym aus E. coli bis zu 1 M Na-Acetat ohne Aktivitätsverlust. Ein ähnlich heterogenes Bild ergibt sich für das Cofaktorbedürfnis von Metallionen wie Magnesium und Eisen sowie das Muster der allosterisch unterschiedlich wirksamen Nucleotide. Die bisher ausgeführten Enzymreinigungen mit klassischen Methoden ähneln sich jedoch trotz dieser Unterschiede, indem einer Streptomycinsulfat- oder Protaminsulfatfällung in der Regel fraktionierte Ammoniumsulfatfällungen (0-40 %) folgen. Die Reinigung wird meist mit Trennungen auf DEAE-Cellulose oder durch Gelfiltration weitergeführt. Affinitätschromatographische Reinigungsschritte mit immobilisierten Nucleotiden, die als allosterische Inhibitoren wirken, erwiesen sich als effektivste und schonendste Methoden und wurden bei

Ribonucleotidreduktasen aus E. coli, T4-Phagen, L. leichmannii und tierischen Geweben mit Erfolg angewendet.

3.3.1 Fällungsschritte

3.3.1.1 Fällung mit Ammoniumsulfat

Für das Algen-Enzym wurden erste orientierende Versuche mit fraktionierter Ammoniumsulfatfällung des Rohhomogenats 5-FUra-stimulierter Zellen durchgeführt. Proben des klaren 30 000 g-Überstandes werden durch Dialyse gegen Ammoniumsulfatlösungen steigender Konzentration in 8 Stunden gefällt, abzentrifugiert, das Pellet jeweils in gleichen Volumina 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6; 1 mM DTT gelöst und 6 Stunden gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Enzymaktivitäten der verschiedenen Fraktionen zeigt Tabelle 5.

Tab. 5: Enzymaktivitätsverteilung der Ribonucleotidreduktase während fraktionierter Ammoniumsulfatfällung

	$(NH_4)_2SO_4$-Sediment (% Sättigung)	Enzymaktivität ($\frac{pMol}{h}$)	Protein ($\frac{mg}{ml}$)
1.	0 - 20	0	0,3
2.	20 - 40	50,2	6,3
3.	0 - 40	62,6	6,8
4.	40 - 90	0	4,8
5.	0 - 40 nach Streptomycin-sulfat	56,6	6,5

Man entnimmt Tabelle 5, daß ausschließlich im Konzentrationsbereich von 20 - 40 % Sättigung Enzymaktivität gemessen wird. Eine vorangestellte Fällung mit Streptomycinsulfat (0,8 %) zur Entfernung der Nucleinsäuren erbringt keine Erhöhung der spezifischen Aktivität, so daß auf diesen Schritt verzichtet werden kann.

Nach 60 Minuten Inkubation mit der 0-40 % Sedimentfraktion wird in der Testmischung etwa 60 % [^{3}H]CTP, im Gegensatz zu ca. 5 % im Rohhomogenat, festgestellt. Gegenläufig sinkt hier der Anteil der Nucleoside von 15-30 % im Rohhomogenat auf etwa 5 %. Durch die fraktionierte Fällung wird offenbar von Phosphataseaktivitäten abgetrennt, so daß nur der Einfluß störender Kinasen auf das Substrat überwiegt und so der Ribonucleotidreduktase Substrat

(CDP) entzogen wird. Diese Wirkung sollte sich vermindern und eine Steigerung des Umsatzes erreichen lassen, wenn man auf ATP im Testgemisch verzichtet und es durch ein anderes Nucleotid als Effektor ersetzt, das kein Phosphatdonator einer Kinasereaktion ist. Hierzu erscheinen Desoxyribonucleosidtriphosphate geeignet. Fällt man Ribonucleotidreduktase mit Ammoniumsulfat (0-40 %) aus dem Rohhomogenat, zentrifugiert, nimmt das Sediment mit 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6, 1 mM DTT auf, dialysiert gegen den gleichen Puffer und testet die Fraktionen in Gegenwart unterschiedlicher dATP Konzentrationen, so ergibt sich eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der dATP-Konzentration wie in Abb. 18.

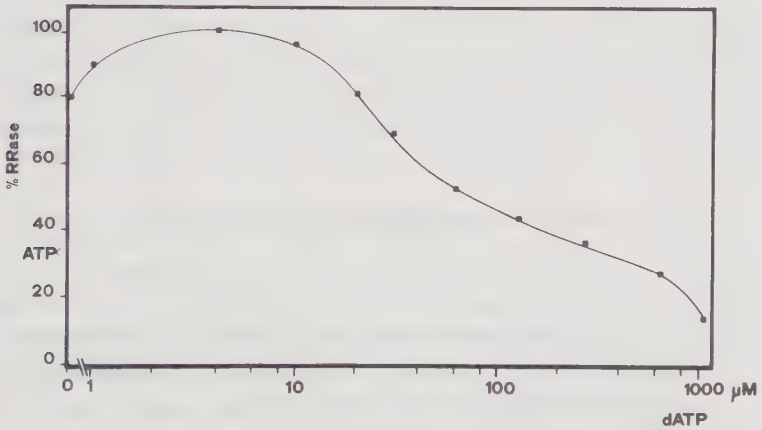


Abb. 18: Abhängigkeit der Ribonucleotidreduktase-Aktivität von der dATP-Konzentration im Test (100 % = 49 pMole/h Desoxycytidin)

Der optimale Bereich der dATP-Konzentration liegt bei 5-15 µM, während mit ATP (3,5 mM) nur 37 % des Maximalwertes erreicht werden, das damit gegenüber der Kontrolle (80 %) sogar inhibiert und zumindest in dieser Konzentration nicht als allosterisch wirksamer Ligand wirkt. Das schmale Maximum der dATP-Wirkung liegt im Vergleich zu ATP bei sehr niedriger Konzentration; schon bei geringer Erhöhung resultiert eine Hemmung wie sie bereits im Rohhomogenat beobachtet wurde (S. 37).

Proben des Rohhomogenates werden durch Ammoniumsulfatlösung verschiedener Konzentration im Dialyseschlauch gefällt, zentrifugiert, das Sediment aufgenommen und gegen 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6/1 mM DTT dialysiert. Man testet nun mit dATP (10 µM) als Effektor und zum Vergleich mit ATP (3,5 mM). Das Ergebnis des Enzymtests zeigt Abb. 19.

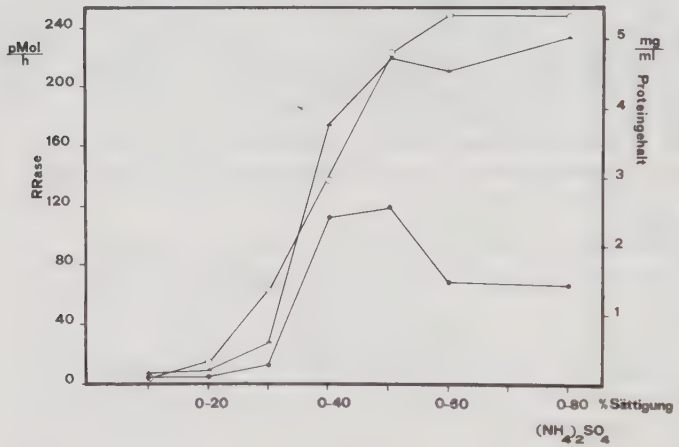


Abb. 19: Fällung der Ribonucleotidreduktase mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration aus dem Rohhomogenat. Sedimentfraktionen getestet mit:
(●) 3,5 mM ATP
(▲) 10 µM dATP
(○) Protein (mg/ml)

Zunächst demonstrieren diese Testreihen wiederum die Überlegenheit von dATP als Effektor, mit dem, unabhängig von der Zusammensetzung des gefällten Proteins, stets höhere Umsätze erzielt werden. Überraschenderweise steigt die Ribonucleotidreduktase-Aktivität im Test mit dATP über 40 % Sättigung hinaus (s. Tab. 5) bis zu etwa 60 % auf etwa den doppelten Umsatz an, während mit ATP eine starke Verminderung der Enzymaktivität auf ein Drittel des Maximalwertes gefunden wird. Auffällig ist auch der große Konzentrationsbereich, der - von 30-60 % Sättigung - zur Ausfällung der gesamten Aktivität notwendig ist. Die Interpretation des Experimentes muß deshalb unterschiedliche Effekte berück-

sichtigen: Einmal wirkt sich der mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration im Sediment gegenläufig wechselnde Einfluß phosphorylierender und dephosphorylierender Konkurrenzreaktionen in Gegenwart von ATP und dATP unterschiedlich aus. Zum anderen besteht der Verdacht, daß Ribonucleotidreduktase zwar bis 40 % Sättigung ausfällt, jedoch bei höheren Konzentrationen noch ein Protein im Sediment angereichert wird, das selbst keine Enzymaktivität besitzt (Tabelle 5), jedoch beträchtlich aktivitätssteigernd wirkt. Neben Thioredoxinen, die in der Tat erst oberhalb 40 % Sättigung ausgefällt werden, kommen noch weitere stimulierende Proteine mit bisher unbekannter Funktion in Frage [82,83]. Auch die Möglichkeit, daß im Rohhomogenat bereits dissoziierte Untereinheiten vorliegen, die bei verschiedener Ammoniumsulfatkonzentration ausgefällt werden, muß in Betracht gezogen werden. Es erscheint allerdings an dieser Stelle noch nicht sinnvoll, zwei Fraktionen (0-40 %; 40-60 %) zu bilden und sie getrennt aufzureinigen, sondern zunächst weitere gemeinsame Reinigungsschritte zu erproben.

3.3.1.2 Reinigung mit Polyethylenimin

Eine erst in jüngster Zeit bekanntgewordene effektive Reinigungsmethode ist die Ausfällung von Protein und Nucleinsäuren mit wasserlöslichem Polyethylenimin (PEI); durch selektives Auflösen des gebildeten Niederschlags mit Salzlösungen definierter Ionenstärke können rasch (ca. 1 Stunde) bis zu 10-30 fache Proteinanreicherungen erzielt werden [92]. Das Fällungsverhalten wird stark von dem Proteingehalt, dem pH-Wert, Art und Konzentration des Puffers sowie dem Molekulargewicht und der Konzentration des Fällungsreagenzes PEI beeinflußt. Deshalb müssen einmal optimierte Bedingungen exakt eingehalten werden. Besonders Phosphate maskieren das polykationische Polyethylenimin und erfordern größere Mengen PEI zur Ausfällung eines bestimmten Proteins, so daß sich die Verwendung von TRIS oder anderen monovalenten kationischen Puffern empfiehlt.

Die Fraktionierung erfolgt durch Zugabe steigender Mengen an Polyethylenimin, wobei die verschiedenen Proteine nacheinander mit überraschend guter Trennwirkung ausfallen.

Zum zentrifugierten Algen-Rohhomogenat, das mit Essigsäure auf pH 7,2 (0°C) eingestellt ist, gibt man schrittweise PEI-Lösung (0,3 %) und entnimmt Proben von jeweils 500 µl, die man zur Ausfällung weitere 20 Minuten bei 0°C beläßt. Nach Zentrifugation bei 5000 g (15 Minuten) werden jeweils 100 µl des Überstandes zur Bestimmung der Ribonucleotidreduktase-Aktivität mit ATP (3,5 mM) als Effektor eingesetzt (Abb. 20). Bereits bei einem Gehalt der Mischung von 0,045 % PEI sinkt die Enzymaktivität auf den Blindwert, während sich der Proteingehalt nur um etwa 35 % verringert.

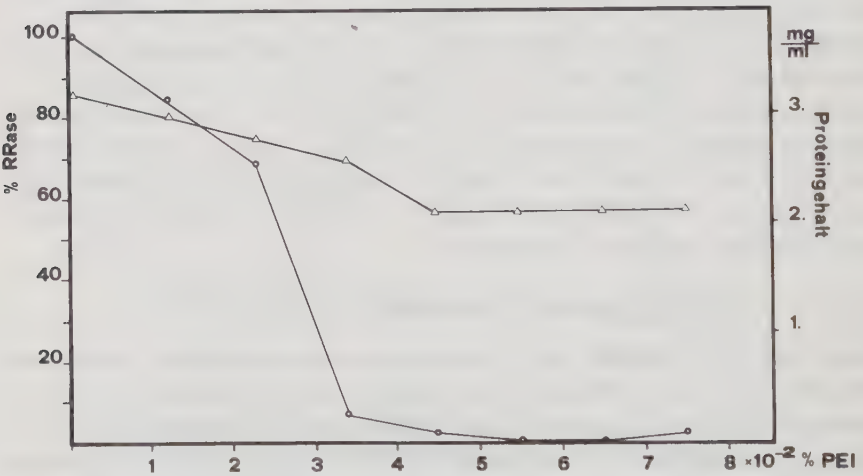


Abb. 20: Prozentuale Abnahme der Ribonucleotidreduktase-Aktivität bei Fällung mit PEI in TRIS-HCl pH 7,2; 1 mM DTT.(●)Ribonucleotidreduktase-Aktivität und Proteingehalt(△)im Überstand.(100 % = 41 pMol/h dC)

Trennt man in einem folgenden Experiment Protein von PEI-Resten aus dem 0,075 % PEI-Überstand durch Ammoniumsulfatfällung (0-80 % Sättigung) ab, kann in dem Sediment keine Ribonucleotidreduktase-Aktivität nachgewiesen werden. Das Ergebnis schließt aus, daß der Kurvenverlauf in Abb. 20 durch Hemmung der Enzymaktivität mit PEI zustandekommt. Um Bedingungen zur selektiven Solubilisierung der Ribonucleotidreduktase aus dem PEI-Proteinsediment zu ermitteln, wird zunächst mit 0,04 % PEI/3,2 mg Protein/ml gefällt, die Suspension in sieben gleichen Anteilen zentrifugiert und die Sedimente jeweils mit gleichen Volumina 50 mM

Phosphatpuffer (pH 6,6; 1 mM DTT) steigenden NaCl-Gehaltes aufgenommen. Man zentrifugiert 20 Minuten bei 30 000 g, dialysiert die Überstände gegen den gleichen Phosphatpuffer und bestimmt die Ribonucleotidreduktase-Aktivität mit dATP als Effektor (Tab. 6).

Tab. 6: Relative Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Extraktionspuffers

Extraktionspuffer	Relative Enzymaktivität
50 mM Phosphat pH 6,6; 1 mM DTT	
ohne Zusatz	55
+ 50 mM NaCl	56
100 mM NaCl	69
200 mM NaCl	91
300 mM NaCl	100
400 mM NaCl	49
500 mM NaCl	49

Man entnimmt Tabelle 6, daß zur vollständigen Extraktion der Ribonucleotidreduktase aus dem PEI-Protein-Sediment 50 mM Phosphatpuffer + 300 mM NaCl geeignet ist. Die Aktivitätsverminderung bei 400 mM und 500 mM NaCl bleibt unverständlich.

Beim Aufnehmen der PEI-Fällung mit Salzlösung hoher Ionenstärke (300 mM NaCl) lösen sich neben extrahierten Enzymen geringe Mengen PEI, während die Hauptmenge des PEI mit Protein ungelöst zurückbleibt. Um Reduktase von PEI-Resten abzutrennen, empfiehlt sich die schon erprobte Ammoniumsulfatfällung.

Es werden deshalb gleiche Volumina des zentrifugierten NaCl-Phosphat-Extraktes gegen Ammoniumsulfatlösungen steigender Konzentration dialysiert, zentrifugiert, die Sedimentfraktionen gelöst und nun gegen 50 mM Phosphat pH 6,6 dialysiert. Ziel des Experiments ist die Bestimmung der $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration, die zur vollständigen Ausfällung der Ribonucleotidreduktase führt. Zusätzlich ist der Vergleich mit dem Fällungsverhalten aus dem Rohhomogenat (Abb. 19) möglich.

In Abbildung 21 sind Ribonucleotidreduktase-Aktivität und Proteingehalt der Sedimentfraktionen dargestellt.

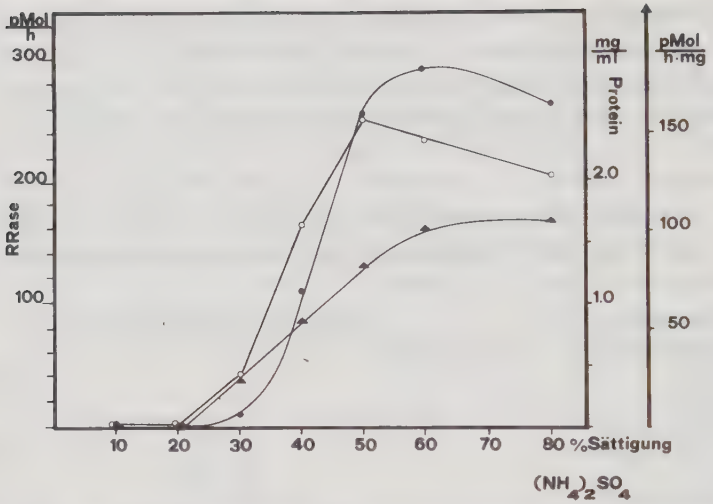


Abb. 21: Fällung der Ribonucleotidreduktase aus 300 mM NaCl/50 mM Phosphatpuffer mit Ammoniumsulfat steigender Konzentration
(●) Ribonucleotidreduktase-Aktivität ($\frac{pMol}{h}$)
(▲) Proteingehalt mg/ml
(⊙) spezifische Aktivität pMol/h x mg

Die Ribonucleotidreduktase-Aktivität weist einen sehr ähnlichen Verlauf und vollständige Ausfällung des Enzyms bei 60 % Sättigung auf, wie auch bei Fällung aus dem Rohhomogenat gefunden wurde (Abb 19). Die Steigerung der Enzymaktivität über 40 % Sättigung hinaus ist hier noch ausgeprägter, da sogar die dreifache Stimulierung erreicht wird, was auf eine weitere Abtrennung störender Enzymaktivität durch PEI-Fällung und Salzextraktion hinweist.

Die Zerlegung des PEI-Proteinkomplexes durch 300 mM NaCl/ 50 mM Phosphat pH 6,6 ist in weiten Grenzen vom Volumen des Puffers unabhängig. So ergaben sich beim Auflösen gleicher PEI-Proteinsedimente mit dem 1 bis 8-fachen Volumen NaCl-Phosphatpuffer und anschließender Ammoniumsulfatfällung (0-60 % Sättigung) des Überstandes nur unregelmäßige Schwankungen ($\pm$ 20 %

der Enzymaktivität und des Proteingehaltes um einen Mittelwert, die keinen Trend erkennen lassen. Um die Bedingungen zukünftig zu standardisieren, werden bezüglich 100 mg Protein im Rohhomogenat 80 ml Puffer zum Lösen des entsprechenden PEI-Proteinsediments verwendet. Folgerichtig wird die Reinigung der Ribonucleotidreduktase durch PEI-Fällung, Lösen des Sediments mit 300 mM NaCl in 50 mM Phosphat pH 6,6 mit anschließender Ammoniumsulfatfällung (0-60 % Sättigung) durchgeführt. Nach dem Aufnehmen des Ammoniumsulfatpellets erfolgt Entsalzung durch Dialyse oder Gelfiltration an Sephadex G-25. Tabelle 7 faßt Enzymaktivität und Proteingehalt einer so durchgeführten Reinigung zusammen, wobei etwa 5 bis 10-fache Proteinanreicherung in etwa 3 Stunden erzielt wird. Enzymaktivität in Zwischenstufen der Reinigung läßt sich wegen der hohen Salzkonzentration und dem PEI-Gehalt, der nur durch nachfolgende Trennungsschritte $(NH_4)_2SO_4$/DEAE-Cellulose abzutrennen ist, nicht bestimmen.

Tabelle 7: Reinigung der Ribonucleotidreduktase

Probe (200 µl)	Volumen (ml)	Protein (mg)	Enzymaktivität (µU)	spez. Akt. ($\frac{mU}{mg}$)	Rel. Proteingehalt (%)
Rohhomogenat	46	112,2	26,8	0,23	100
			*103,5	*0,92	
nach G-25-Gelfiltration	22	21,3	496,0	23,3	19

* mit ATP (3,5 mM) als Effektor

Wie Tabelle 7 zeigt, ist eine Ausbeuteberechnung der Enzymaktivität problematisch. Testet man auch im Rohhomogenat mit dATP als Effektor, findet man nur sehr geringe Enzymaktivität (1,4 % dC/h); setzt man dagegen ATP ein, erhöht sich zwar der Umsatz auf 5,4 % dC/h, aber der direkte Vergleich zu anderen Messungen fehlt. Die große Steigerung der spezifischen Aktivität um etwa das 100-fache mit dATP und 25-fache mit ATP in der Testmischung kann durch drastische Verminderung der störenden Enzymaktivitäten erklärt werden, obwohl eine quantitative Abschätzung schwer möglich ist. So zeigen Fraktionen

dieser Reinigungsstufe nach 60 Minuten Inkubationszeit im Testgemisch neben 73 % Diphosphat nur 21,5 % Nucleosidtriphosphat und 5,5 % Monophosphat, Nucleoside und Nucleobasen. Da keine Uridinderivate und gegenüber dem Blindwert kein erhöhter Cytosingehalt gefunden wird, scheint der größte Teil aller den Test störenden Enzymaktivitäten bereits abgetrennt zu sein. Bei allen folgenden Enzymreinigungen beziehen sich deshalb Ausbeuteberechnungen auf diese Reinigungsstufe (G-25), da nur hier direkt vergleichbare Testbedingungen vorliegen. Verglichen mit der Reinigung anderer Enzyme durch PEI-Fällung ist die hier erzielte Anreicherung recht gering [91], läßt sich aber durch den großen Bereich der Ammoniumsulfatkonzentration erklären (0-60 % Sättigung), der zur vollständigen Ausfällung der gesamten Enzymaktivität nötig ist.

3.3.2 Versuche zur Enzymreinigung mit klassischen Methoden

Nahezu alle Versuche, Ribonucleotidreduktase mit klassischen Methoden in akzeptablen Ausbeuten weiter zu reinigen, schlugen fehl. Chromatographie von Ribonucleotidreduktase an DEAE-Cellulose unter schrittweiser Elution mit Phosphat oder NaCl erbrachten zwar aktive Enzymfraktionen, jedoch stets nur mit 3-5 % Ausbeute (bei Elution mit 100 mM Phosphat oder 150 mM NaCl), während im Durchbruch keine Enzymaktivität zu finden war. Auch Rekombinationsexperimente der Durchbruchsfraktion mit Fraktionen von 100 mM, 250 mM und 1 M Phosphat zeigten keine Erhöhung der Aktivität. Selbst diese geringeren Umsätze treten nicht mehr auf, wenn lineare Salzgradienten verwendet werden. Interessant ist der Einfluß der Säulenabmessungen auf die Ausbeute an Ribonucleotidreduktase-Aktivität: Bei konstantem Säulendurchmesser von 1 cm findet man bei 11 cm Säulenhöhe 0 %, bei 3,2 cm 18,75 % und bei 1 cm 100 % Enzymausbeute (Anreicherun 1,75-fach), wenn jeweils schrittweise mit 150 mM NaCl eluiert wird. Demgegenüber werden bei 1 cm Säulenhöhe mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-300 mM) nur 6,9 bis 14,0 % Ausbeute verzeichnet. Bei Verwendung sehr kurzer DEAE-Cellulosesäulen kann deshalb eine - wenn auch geringe - Reinigung unter guter Ausbeute erzielt werden; sie erschienen aber solange nicht ratsam anzuwenden, als die Ursachen für das Verhalten des Enzyms nicht aufgeklärt sind.

Ribonucleotidreduktase wird in 20 mM MES-Puffer pH 5,8 nicht an CM-Cellulose gebunden, was besonders im Hinblick auf eine Affinitätselution [84] mit CDP, ATP oder dATP von Interesse gewesen wäre.

Ähnliche Schwierigkeiten wie bei DEAE-Cellulose-Chromatographie bestehen auch bei Gelfiltration von Ribonucleotidreduktase-Lösungen. Während die Passage über Sephadex G-25 (Tab. 7) keinen Aktivitätsverlust bewirkt, beträgt die Ausbeute des Enzyms nach Gelchromatographie an Sephadex G-100 nur etwa 3 %. Es lassen sich zwei distinkte Peaks geringer Enzymaktivität, nämlich bei 80 000 und ein weiterer bei höherem Molekulargewicht im Ausschlußvolumen reproduzierbar nachweisen, ihre Aktivität reicht jedoch zur weiteren Reinigung bei weitem nicht aus. Gelfiltration an Sephadex G-100 in Gegenwart hoher Salzkonzentration (250 mM NaCl), mit Detergenz (0,05 % Triton X 100) oder in Anwesenheit von Magnesium (5 mM) und Eisensalzen (0,05 mM) erbrachten ebensowenig Fortschritte wie der Wechsel zu Sephacryl S-200, das mit höherem Durchfluß etwa gleiche Trenneigenschaften wie Sephadex G-200 zeigt [85]. Konzentrieren der verdünnten Proteinlösung mit Millipore-Eintauchfiltern oder durch Ammoniumsulfatfällung (0-80 %) und anschließende Dialyse bewirkten keine der Volumenabnahme entsprechende Aktivitätserhöhung, sondern sogar ein Absinken bis fast zum Blindwert. Ebenso blieben Rekombinationexperimente der verdünnten und ankonzentrierten Fraktionen ohne Erfolg, auch wenn Serumalbumin zugesetzt und mit Mg^{2+}, Coenzym B_{12} oder CTP als Substrat getestet wurde. Eine Abtrennung von Thioredoxin nach einer Gelfiltration, das als essentieller Bestandteil im Assay fehlen würde, ließ sich ausschließen, indem Thioredoxin aus E. coli oder aus Scenedesmus zur Testmischung supplementiert wurde, ohne daß sich eine Aktivitätssteigerung ergab. Die Abtrennung anderer wichtiger niedermolekularer Bestandteile der Ribonucleotidreduktase ist wenig wahrscheinlich, weil dann bei G-25-Gelfiltration oder Dialyse das gleiche Verhalten zu erwarten wäre. Gegen eine Inaktivierung des Enzyms durch Assoziation spricht, daß in Anwesenheit hoher Ionenstärke oder Detergenz gleichfalls nur niedrige Ausbeuten gefunden werden.

Zwei weitere Interpretationen erscheinen diskussionwürdig. Das Gelmaterial selbst könnte Ribonucleotidreduktase entweder inaktivieren oder so fest binden, daß die Elution nur bei Bedingungen gelingt, die zum Aktivitätsverlust führen. Die andere Möglichkeit ist, daß Reduktase aus Scenedesmus aus mehreren Untereinheiten besteht, deren Zusammenhalt allerdings so schwach ist, daß sie durch Gelfiltration voneinander getrennt werden und erst in Kombination Enzymaktivität aufweisen. Die Molekulargewichte jeder Untereinheit müßten größer als 5000 sein, jedoch mindestens eine Untereinheit ein wesentlich kleineres Molekulargewicht als 150 000 besitzen, wie sich bei Kenntnis der Ausschlußgrenzen von Sephadex G-25 und G-100 abschätzen läßt. Für diese Interpretation spricht einiges: So finden der große Konzentrationsbereich der Ammoniumsulfatfällung (30-60 % Sättigung) und die weitergehende Stimulierung über 40 % Sättigung hinaus ihre Erklärung. Auch besteht eine augenfällige Analogie zur Ribonucleotidreduktase aus Ratten-Novikoff-Tumor. E. C. Moore bemerkt bei der Reinigung dieses Enzyms an DEAE-Cellulose, daß die Säulenhöhe von 1 cm "kritisch" sei und bei einer Erhöhung mit stark erniedrigten Ausbeuten gerechnet werden muß [68]. Inzwischen wurde nachgewiesen, daß Novikoff-Ribonucleotidreduktase aus zwei nichtidentischen Untereinheiten mit Molekulargewichten von 180 000 und etwa 90 000 Dalton besteht [86].

Trennungen ohne Einfluß einer Gelmatrix lassen sich durch Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation in Saccharosegradienten durchführen [65]. Nach 40 stündiger Zentrifugation von 1 ml Rohhomogenat bei 40 000 upm im SW 40 Schwingbecherrotor mit einem linearen Saccharosegradienten (20-40 %) konnte keine Enzymaktivität wiedergefunden werden, während Markerproteine (Katalase, MDH) gut voneinander abgetrennt sind und die Enzymaktivität in Kontrollproben (40 Stdn. ohne Zentrifugation) noch vorhanden ist. Wählt man jedoch zur Trennung suboptimale Bedingungen, nämlich nur 12-stündige Zentrifugation bei 270 000 Upm im gleichen Rotor mit einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten und großem Probenvolumen (7,5 ml), so findet man 38 % der eingesetzten Enzymaktivität wieder.

Beide Ergebnisse bestätigen die Arbeitshypothese insofern, daß bei 40-stündiger Zentrifugation eine Trennung der vermuteten Untereinheiten erreicht wird, während in 12 Stunden noch keine vollständige Trennung eintritt, sich die Proteine teilweise überlagern und so zu einer meßbaren Enzymaktivität führen. Sollte dagegen das Säulenmaterial der einzig inaktivierende Faktor sein, ist auch nach länger dauernder Zentrifugation Enzymaktivität zu erwarten. Diese Vorgangsweise belegt zwar die Hypothese mehrerer Untereinheiten noch nicht eindeutig, muß jedoch als ein wichtiger Hinweis gedeutet werden. Dagegen spricht, daß alle bisher durchgeführten Rekombinationsexperimente nach DEAE -Cellulose- oder G-100-Trennung erfolglos waren.

Ein definitiver Nachweis dafür, daß Ribonucleotidreduktase aus mehreren Untereinheiten besteht und durch Rekombinationsexperimente die Enzymaktivität zu rekonstituieren ist, war offenbar nur mit ganz anderer Methodik zu erbringen.

3.3.3 Affinitätschromatographische Trennungen

3.3.3.1 An 2',5'-ADP-Sepharose

Affinitätschromatographische Reinigung von Ribonucleotidreduktasen wurden mit trägerfixierten Desoxyribonucleotiden, die als allosterische Effektoren wirken, durchgeführt [87]. Auch von der gruppenspezifischen Bindung des Enzyms bzw. einer Untereinheit aus Novikoff- und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen an "Blue-Sepharose" dem kovalent an eine Sepharosematrix gebundenen blauen Farbstoff Cibacron Blue F3G-A, wurde kürzlich berichtet [88,89]. Es gelingt in beiden Fällen eine Trennung in zwei Untereinheiten, von denen eine nicht oder wenig gebunden wird, und eine zunächst gebundene Untereinheit entweder mit dem löslichen Farbstoff oder mit 50 mM ATP bzw. 30 % DMSO/2 mM ATP wieder eluiert wird. Demgegenüber ist die Bindung und Reinigung an der käuflichen 2',5'-ADP-Sepharose, einem "general ligand", mit Ribonucleotidreduktasen noch nicht durchgeführt worden. Außer NADP(H)-abhängigen Dehydrogenasen und Kinasen binden auch Transhydrogenasen mit einer Nucleotidbindungsstelle an immobilisiertes 2',5'-ADP [90].

Man kann deshalb erwarten, daß ebenso auch andere nucleotidbindende Enzyme wie Ribonucleotidreduktase an 2',5'-ADP-Sepharose zu reinigen sein sollten, wobei Bindung an Substrat- oder Effektor-Sites in Frage kommt. Da das trägergebundene Nucleotid, eine NADP-Teilstruktur, eine Vielzahl von Enzymen bindet [90], läßt sich der Reinigungserfolg (Anreicherung) am ehesten über den Desorptionsschritt, idealerweise mit einem Effektornucleotid, beeinflussen.

Die affinitätschromatographischen Untersuchungen gehen von einer angereicherten Fraktion aus, die man durch PEI-Fällung, fraktioniertes Wiederauflösen des Pellets und Ammoniumsulfatfraktionierung mit anschließender Dialyse erhält (3.3.1.1). Ausgefallenes Protein wird abzentrifugiert und der klare Überstand sogleich zur Affinitätschromatographie eingesetzt. Da bei Trennungen an DEAE-Cellulose dann hohe Ausbeuten gefunden werden, wenn die Säulenhöhe möglichst gering ist, verwenden wir auch hier nur eine Füllhöhe von 1,0 bis 2,0 cm bei 1,0 cm Durchmesser. In der Durchbruchsfraktion mißt man nur geringe Umsätze (ca. 2 %), ebenso im dialysierten Eluat, wenn gebundenes Protein mit 5 mM ATP, NAD(H), NADP(H), 1 mM dATP bei 0° und 20°C oder bis zu 500 mM NaCl in 50 mM Phosphatpuffer desorbiert wird. (Das Enzym wird dagegen gar nicht gebunden, wenn die aufgegebene Lösung 500 mM NaCl enthält.) Man gibt die teilgereinigte Reduktase mit 10 ml/h Durchfluß auf die Säule, wäscht mit 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6 bis kein unspezifisch gebundenes Protein mehr in der Waschlösung nachweisbar ist, eluiert mit 3 ml 1 mM dATP in 50 mM Phosphatpuffer und dialysiert anschließend 8 Stunden mit zweimaligem Wechsel gegen je 500 ml des gleichen Puffers. Dabei entweicht dATP, das in dieser Konzentration die Enzymaktivität inhibiert, in den Dialysepuffer. Rekombiniert man nun zu gleichen Teilen nichtgebundenes Protein mit dem dialysierten dATP-Eluat, so findet man Rekonstituierung der Enzymaktivität. Tabelle 8 faßt das Ergebnis eines Rekombinationsexperimentes zusammen.

Tab. 8: Ribonucleotidreduktase-Aktivität (pMol/h) einer ADP-Sepharose-Durchbruchs- und dialysierten dATP-Eluatfraktion einzeln und in Kombination

Probe	RRase-Aktivität (pMol/h)	Stimulation
100 µl Durchbruchsfraktion	1,2	-
100 µl dATP-Eluat	2,2	-
je 100 µl Kombination	191	56.1

Dieses Experiment zeigt eindeutig, daß Ribonucleotidreduktase aus mindestens zwei Untereinheiten aufgebaut ist, die unter geeigneten Bedingungen leicht aufgetrennt werden und ohne Zusatz weiterer Faktoren wie Metallionen unter Erhalt der Enzymaktivität rekombinieren. Im folgenden wird die an ADP-Sepharose bindende Untereinheit mit U1, die nicht bindende mit U2 bezeichnet. Auf diese Weise kann die gebundene Komponente durch Affinitätschromatographie gereinigt werden, während für die nicht-gebundene eine separate Reinigung anzuschließen ist. Als Alternative wäre eine affinitätschromatographische Reinigung des intakten Enzyms wünschenswert. Sie wurde versucht, indem bei 5 mM Phosphat oder in Anwesenheit von Magnesium (1 mM) gearbeitet wurde, gelang jedoch in keinem Falle. Daher war in folgenden Experimenten eine Optimierung für die Reinigung der bindenden Untereinheit anzustreben: Elution mit 1 mM dATP gegenüber ATP (1 mM und 5 mM) ist vorteilhaft, weil 13-fach weniger Fremdprotein erhalten wird, wie sich aus dem Proteingehalt und der Anzahl der Proteinbanden nach einer SDS-Gelelektrophorese zeigt. In gleicher Weise wirkt eine Verringerung der Phosphatkonzentration des Elutionspuffers von 50 mM auf 10 mM, so daß die gebundene Untereinheit mit 1 mM dATP in 10 mM Phosphat pH 6,6, 1 mM DTT von der Säule abgelöst wird. Der Einfluß der dATP-Konzentration im Elutionspuffer im Bereich von 100 µM dATP ist in Abb. 22 aufgezeigt. Man gibt die teilgereinigte Enzymlösung auf die Affinitätssäule, wäscht mit 2,5 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 6,6 und 2,5 ml 10 mM Phosphatpuffer pH 6,6 nach und eluiert schrittweise mit je 2,0 ml der angegebenen dATP-Lösung in 10 mM Phosphat pH 6,6. Die Eluatfraktionen werden über Nacht dialysiert, je 100 µl mit dem gleichen Volumen des Durchbruchs vermischt und getestet.

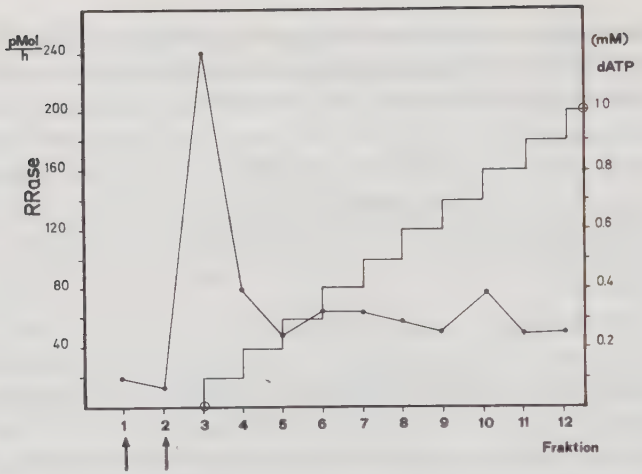


Abb. 22: (●)Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von der dATP-Konzentration bei diskontinuierlicher Elution an 2',5'-ADP-Sepharose (1x1 cm) in 100 µM Schritten von 0,1-1 mM dATP (o) in 10 mM Phosphat pH 6,6.Durchflußgeschwindigkeit: 10 ml/h; 2 ml/Fraktio
Zum Test wird mit 100 µl Durchbruchsfraktion (1:1) supplementiert
1 → Durchbruchfraktion
2 → Waschfraktion

Fraktion 3 (100 µM dATP) enthält 31 % der wiedergefundenen Aktivität, die sich in den folgenden Fraktionen auf etwa 50 pMol/h einpendelt, ohne jedoch auf den Nullwert zurückzugehen. Die Ausbeute der Trennung beträgt 32 %, während mit einem "Puls" von 3,5 ml 1,0 mM dATP 73,5 % erhalten werden. Die Trennung auf SDS-Gelelektrophorese zeigt keinen Unterschied des Bandenmusters bei Verwendung von 100, 200, 300 µM dATP bis 1 mM dATP, so daß 1 mM beibehalten wird. Die Selektivität des Desorptionsschrittes läßt sich demnach nicht durch Verminderung der dATP-Konzentration erhöhen. Geringe Enzymaktivität in der Durchbruchsfraktion tritt dann auf, wenn konzentrierte Proteinlösungen zur Trennung kommen. Eine möglichst konzentrierte Durchbruchsfraktion mit einem hohen Gehalt der nichtgebundenen Untereinheit muß jedoch deshalb erhalten werden, weil die

Enzymaktivität nach Art einer Massenwirkungsbeziehung von der Konzentration beider für sich inaktiver Teile abhängt.

3.3.3.2 Vergleich mit anderen Affinitätsmaterialien

Nach der Optimierung der Trennbedingungen für 2',5'-ADP-Sepharose wurden auch andere Affinitätsmaterialien erprobt und verschiedene Kriterien zur Beurteilung der Trennungen berücksichtigt. Verwendung fanden außer 2',5'-ADP-Sepharose die kommerziell erhältliche 5'-AMP-Sepharose und Blue-Sepharose Cl-6B sowie dATP-γ P-Sepharose [93]. (Eine Probe stellte dankenswerterweise M. Pries zur Verfügung.) Zusätzlich werden zwei weitere Varianten der Trennbedingungen an 2',5'-ADP-Sepharose erprobt. Erhöht man im Waschpuffer die Ionenstärke mit 100 mM NaCl, so erwartet man, daß mehr unspezifisch gebundenes Protein abgelöst wird. Indessen ist fraglich, ob und in welchem Ausmaß die an 2',5'-ADP bindende Untereinheit bei diesen Bedingungen an der Säule verbleibt und im Elutionsschritt wiedergefunden werden kann. Zweitens wird eine Säule mit 5 ml BSA (1 mg/ml) vorgespült. Diese Maßnahme ist für die Reinigung von Poly(A)-Polymerase (EC 2.7.7.19) günstig gewesen; [94] man vermutet, daß die hydrophoben Bereiche (Spacer Arms) Albumin anlagern und das Enzym in einer "hydrophilen" Umgebung an der Säule gebunden bleibt. BSA könnte hier die Selektivität der Bindung von U1 vergrößern, indem unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zugunsten einer spezifischen Bindung zurückgedrängt werden.

Auf diese Affinitätsgele (je 1 ml) werden je 1,2 ml der teilgereinigten Ribonucleotidreduktase in 200 µl-Portionen aufgegeben. Man läßt einsickern, bevor der nächste Teil zugesetzt wird. Lediglich die letzten 400 µl werden als Durchbruchsfraktion aufgefangen um eine Verdünnung auf der Säule auszuschließen. Die Waschfraktionen (5 mal je 500 µl Phosphatpuffer) wird verworfen. Elution der gebundenen Untereinheit erfolgt wiederum portionsweise mit 5 mal 200 µl 1 mM dATP in 10 mM Phosphat. Nach der Dialyse (10 Stunden gegen 2 Liter 50 mM Phosphatpuffer mit dreimaligem Wechsel) testet man einzeln und in Kombination (1:1) mit den entsprechenden Durchbruchsfraktionen, deren Enzymaktivität ebenfalls bestimmt wird. Nach 60 Minuten

Inkubation werden der abgestoppten Testmischung 20 µl entnommen und auf PEI-Cellulose aufgetrennt um die Nucleotidphosphorylierung zu ermitteln. Außerdem werden Proteingehalte gemessen und die Zusammensetzung der dATP-Eluatfraktionen durch Trennung auf SDS-Gelelektrophorese verglichen. Die Information von Proteinausbeute, Bandenmuster, Enzymaktivität der Einzel- und Rekombinationstests sowie der Anteil phosphorylierender und hydrolytischer Enzymaktivitäten lassen eine Beurteilung der Trennungen in Abhängigkeit von der Art des Affinitätsmaterials zu. Tabelle 9 faßt die Resultate zusammen.

Die Trennung in zwei für sich inaktive Komponenten U1 und U2, die erst kombiniert das katalytisch aktive Enzymmolekül bilden, gelingt nach Tab. 9 neben 2',5'-ADP-Sepharose auch mit Blue-Sepharose, dATP-γP-Sepharose, jedoch nur schlecht mit 5'-AMP-Sepharose. Bei Ausbeuteangaben für Ribonucleotidreduktase muß in Betracht gezogen werden, daß die Höhe des Umsatzes der Rekombinationstests von Menge und Verhältnis beider Untereinheiten U1 und U2 abhängt. Der "Stimulationsfaktor" in Tabelle 9 korrigiert diesen Umsatz, indem nur der zusätzliche Aktivitätszuwachs über die Summe der Einzelaktivitäten hinaus berücksichtigt wird. Bei günstigen Trennbedingungen, nämlich minimaler Durchflußgeschwindigkeit und geringer Proteinkonzentration findet man Enzymaktivitäten von 1-4 pMol/h in Durchbruchsfraktionen (U2) und meist noch geringere Werte in den dATP-Eluaten (U1), so daß auch der Stimulationsfaktor höhere Werte erreicht (s. Tab. 8). Meßbare Enzymaktivitäten von U1 und U2 weisen deshalb auf die unvollständige Trennung und "Verunreinigung" mit der jeweils komplementären Untereinheit hin, wie besonders bei 5'-AMP- und 2',5'-ADP-Sepharose auffällt.

Nur wenn die Prämisse richtig ist, daß die Enzymaktivität in rekombinierten Tests (U1 + U2) linear vom unterschiedlichen Gehalt an U1 in den dATP-Eluatfraktionen abhängt, während die Konzentration von U2 in den Durchbruchsfraktionen konstant ist, kann die Aktivität (U1 + U2) als Meßzahl der Ausbeute von U1 betrachtet werden. Die Angabe von "% Ausbeute" ist deshalb mit Unsicherheiten behaftet und nur mit Vorbehalt zu akzeptieren

Tab. 9:

Affinitätsmaterial	RRase-Aktivität (pMol/h)			Stimulation der RRase-Aktivität	Proteingehalt (mg/ml)		Ausbeute %	spez. Akt. $(\frac{pMol}{h \cdot mg})^{++}$	Nucleotidverteilung nach 60' Inkubation	
	U_1	U_2	U_1+U_2		U_2	U_1			% Triphosphat	% Monophosph + Nucleosid
"Blue-Sepharose"	5,3	0,3	67,9	12,1	2,06	0,17	7,3	366	43,9	0
2',5'-ADP-Sepharose	1,7	2,5	119,4	28,4	1,62	0,22	12,8	523	25,6	6,7
5'-AMP-Sepharose	13,9	6,8	30,3	1,4	1,08	0,71	3,25	13,5	35,1	4,3
dATP-γP-Sepharose	2,1	5,4	114,1	15,2	2,26	0,12	12,2	888	0	6,5
2',5'-ADP-Sepharose (Waschen mit 0,1 M NaCl)	4,0	5,3	55,4	5,95	1,2	0,06	5,94	768	42,5	3,0
2',5'-ADP-Sephar + BSA (1 mg/ml)	11,2	9,5	116,7	5,63	3,32	0,21	11,1	457	36,6	5,3

Kapazitäten an immobilisiertem Nucleotid: 1,7-2,0 µMol/ml Gel

++ Die spezifische Aktivität berechnet sich: $\frac{\text{Enzymaktivität}\,(U_1+U_2) - \text{Einzelaktivität}\ U_1,\ U_2}{\text{Proteingehalt}\ U_1\ (mg/ml)}$

Die Ribonucleotidreduktase-Aktivität (U1 + U2) erreicht bei 2',5'-ADP mit und ohne BSA-Einwirkung, sowie dATP-γP vergleichbar hohe Werte und sinkt für Blue-Sepharose auf etwa die Hälfte. Waschen mit 100 mM NaCl löst nichtspezifisch so viel U1 von 2',5'-ADP-Sepharose ab, daß gleichfalls nur 50 % gegenüber der Kontrolle erreicht werden. An 5'-AMP-Sepharose wird wenig Enzymaktivität wiedergefunden, dieses Affinitätsmaterial ist somit unbrauchbar.

Durch Verwendung von NaCl im Waschpuffer erreicht man zwar eine höhere spezifische Aktivität (768 pMol/h · mg), jedoch auf Kosten der Ausbeute, so daß bei folgenden Untersuchungen ohne Salz nachgewaschen wird (523 pMol/h · mg). BSA-Vorbehandlung der Säule erbringt hier keinen der erhofften Vorteile, jedoch auch keine Einbuße der Ausbeute. Typisch ist hier die hohe Enzymaktivität der Durchbruchsfraktion (U2). Die Ursache liegt bei der erhöhten Proteinkonzentration, die zusätzlich durch BSA in der Säule entsteht.

Zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden je 750 µl der U1 Fraktionen eingesetzt. Abb. 24 zeigt die angefärbten Bandenmuster und illustriert die unterschiedliche Proteinzusammensetzung und Menge in Abhängigkeit vom Affinitätsmaterial.

Eine Zuordnung der Proteinbanden ist auf dieser Reinigungsstufe noch nicht möglich. So enthält die U1-Fraktion von dATP-γP-Sepharose mindestens 15 unterscheidbare Proteinbanden, so daß auch noch kein monospezifisches Affinitätsmaterial vorliegt. Keine Unterschiede sind zwischen BSA-vorbehandelter 2',5'-ADP-Sepharose und der nicht behandelten Kontrolle festzustellen. Insgesamt geringere Intensität zeigen die Proteine der 2',5'-ADP-Sepharose (100 mM Salz) und Blue-Sepharose Trennung, die ebenfalls auch sehr geringe Ausbeuten der Ribonucleotidreduktase aufweisen, denen allerdings der intensiv angefärbte Bereich um 56 000 fehlt. Damit scheidet aus, daß diesem Bereich die U1-Untereinheit der Ribonucleotidreduktase zugeordnet werden kann.

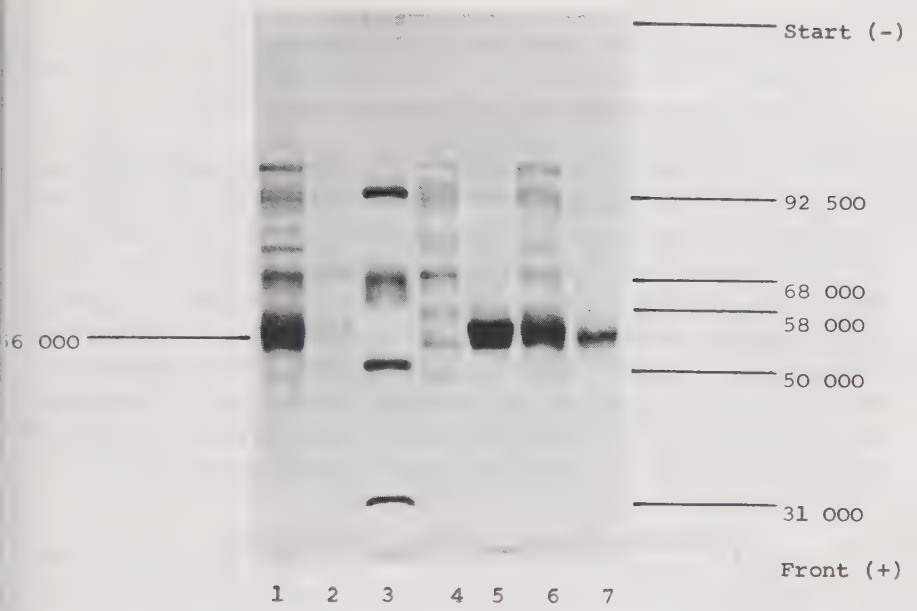


Abb. 23: SDS-PAGE (8 %) der dATP-eluierten Proteine von verschiedenen Affinitätsmaterialien

(1) 2',5'-ADP-Sepharose (BSA-vorbehandelt)
(2) 2',5'-ADP-Sepharose (100 mM NaCl im Waschpuffer)
(3) Markerproteine: Phosphorylase a, BSA, Katalase, Fumarase, Ei-Albumin, Carboanhydrase, Cyt c (Front
(4) dATP-γ P-Sepharose
(5) 5'-AMP-Sepharose
(6) 2',5'-ADP-Sepharose
(7) Blue-Sepharose

dATP-γ-P-Sepharose scheint den käuflichen Affinitätsmaterialien überlegen, da es die Vorteile hoher Ausbeute und spezifischer Aktivität sowie Abtrennung der Kinaseaktivität in sich vereint. Das schwierig zu synthetisierende Material konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht für präparative Zwecke eingesetzt werden.

3.3.4 Separate Reinigung der Untereinheiten

3.3.4.1 Chromatographische Reinigung von U2

Beide affinitätschromatographisch getrennten Ribonucleotid-reduktase-Untereinheiten müssen separat weitergereinigt werden. Zum Test der Komponente U2 (Durchbruchsfraktion) muß jeweils die komplementäre Untereinheit U1 (dATP-Fraktion) zugesetzt werden und umgekehrt. Dabei ist eine zwischengeschaltete Gelfiltration an Sephadex G-25 zur Abtrennung von dATP unvorteilhaft, weil bei dieser Verdünnung keine oder nur geringe Enzymaktivität im Kombinationstest gemessen werden kann; Dialyse ist deshalb vorzuziehen. Mischungen beider homologer Untereinheiten zeigen den in Abb. 24 dargestellten linearen Verlauf der Enzymaktivität.

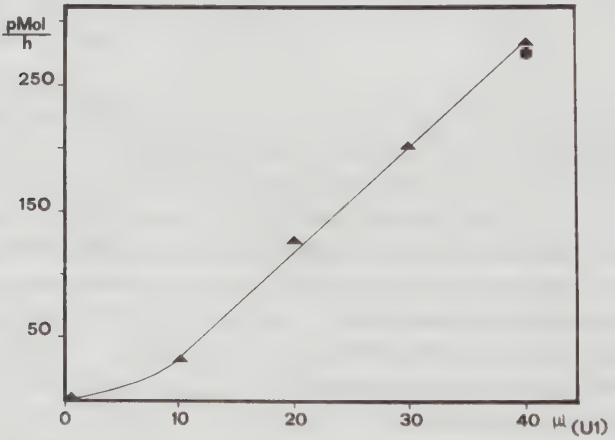


Abb. 24: RRase-Aktivität in Abhängigkeit von der U1-Konzentration
U1: 73 µg/ml
(●) 1,7 mg U2/ml; (▲) 3,4 mg U2/ml

Eine Sättigung mit U1 wird unter diesen Bedingungen nicht erreicht. Bei Verringerung der U2-Konzentration auf die Hälfte scheint U1 immer noch limitierend. Ob diese Konzentrationsverhältnisse durch die Reinigungsprozedur bedingt sind oder auch in vivo bestehen, kann nicht entschieden werden.

Zur raschen Trennung der instabilen Ribonucleotidreduktase müssen alle Reinigungsschritte "blind" durchgeführt werden. Ferner verbietet sich das Arbeiten mit verdünnten Enzymlösungen, weil beide Untereinheiten in möglichst konzentrierter Lösung zum Kombinationstest eingesetzt werden müssen und gängige Konzentrierungsmethoden an Membranen zur irreversiblen Inaktivierung führen. Am besten werden daher die Untereinheiten stets durch diskontinuierliche Elution vom Säulenmaterial desorbiert. Dies setzt genaue Kenntnis der Elutionsbedingungen voraus, die zunächst mit Hilfe kontinuierlicher Salzgradienten an Butylagarose, DEAE-Cellulose und Hydroxylapatit ermittelt werden. Alle folgend beschriebenen Bestimmungen der Ribonucleotidreduktase-Aktivität erfolgen mit gleichen Volumina (100 µl) der dialysierten Proben (U2) und des dATP-Eluats (U1).

Gelfiltration

Gelfiltration an Sephadex G-100 erlaubt über die Reinigung hinaus Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Untereinheit 2. Das Elutionsdiagramm (Abb. 25) zeigt in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen den Proteingehalt und die Ribonucleotidreduktase-Aktivität mit und ohne Zugabe von U1.

Im Gegensatz zu bisherigen Gelfiltrationsexperimenten mit sehr geringer Ausbeute gelingt es auf dieser Stufe mit Hilfe des Kombinationstests, eine Stimulation der Enzymaktivität um den Faktor 5 zu erreichen. Maximaler Umsatz wird im Molekulargewichtsbereich 70-80 000 gefunden.

Da auch von der Hauptmenge des Proteins abgetrennt wird, erzielt man eine 5-fache Anreicherung der Untereinheit bei insgesamt 150 % Ausbeute der eingesetzten Enzymaktivität. Der paradoxe Effekt hängt offenbar mit den Mengenverhältnissen beider Untereinheiten im Test zusammen: Wenn selbst nach der Verdünnung von U2 durch die Gelfiltration U1 die begrenzende Untereinheit bleibt, ergibt sich rechnerisch mehr U2 und damit eine höhere Gesamtaktivität.

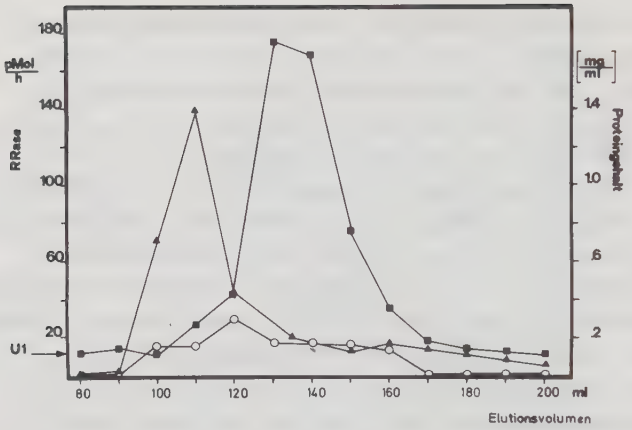


Abb. 25: Chromatographie der U2-Untereinheit an Sephadex G-100
(▲) Proteingehalt
(■) RRase-Aktivität in Kombination beider Untereinheiten je 100 µl (1:1)
(o) RRase-Aktivität ohne Zusatz (100 µl)
U1→ Kontrolle: Umsatz von U1 allein

Hydrophobe Chromatographie

An den Oberflächen löslicher Proteine befinden sich hydrophobe "Taschen", die sich in ihrer Anzahl, Zugänglichkeit und Größe unterscheiden. Die Wechselwirkungen dieser Bereiche mit geeigneten Materialien wie N-Alkyl-Agarosen führen deshalb zur Fraktionierung einer Proteinmischung. Die Trennbedingungen lassen sich optimieren, indem neben Adsorptions- und Elutionsbedingungen auch die Zahl der Kohlenstoffatome im Molekül variiert wird. So kann mit Hilfe der Hydrophoben Chromatographie in günstigen Fällen mehr als 100-fache Reinigung erzielt werden [114].

Es werden je 1 ml Alkyl-Agarose (Miles) der allgemeinen Formel Agarose-$(CH_2)_{n-1}CH_3$ unterschiedlicher Kettenlänge n = 2,4,6,8,10 und n=o (Agarose als Kontrolle) verwendet, die mit 50 mM Phosphat pH 6,6/ 1 mM DTT äquilibriert sind. Man gibt je 200 µl Proteinlösung (U2) auf und wäscht mit 2 ml Puffer nach. Der relative

Proteingehalt und die im Kombinationstest bestimmte Ribonucleotidreduktase-Aktivität des Eluats sind in Abb. 26 gezeigt.

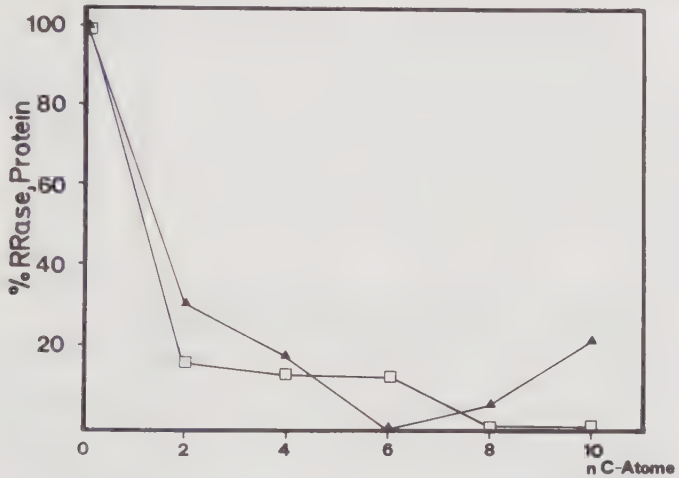


Abb. 26: Hydrophobe Chromatographie der U2-RRase-Untereinheit an Agarose-$(CH_2)_{n-1}CH_3$
Relativer Proteingehalt (□) und RRase-Aktivität (▲) im Eluat in Abhängigkeit von der Kettenlänge

Die Wirkung der N-Alkylreste ist frappant, da bereits bei Ethyl-Agarose (n=2) nur 17% des Kontrollwertes von Agarose (n=o) im Eluat wiedergefunden werden. Die Bindung der Ribonucleotidreduktase ist bei n=6 vollkommen. (Dieses Verhalten läßt rückblickend vermuten, daß ein Teil von U2 auch bei der Affinitätschromatographie an ADP-Sepharose adsorbiert wird, weil das Nucleotid über einen n-Hexylspacer mit Sepharose verknüpft ist.)

Zur Reinigung der Untereinheit wählten wir allerdings Butyl-agarose, die zwar U2 nicht bestmöglich bindet [96], von der es jedoch leicht und ohne Verwendung organischer Lösungsmittel wieder abgelöst werden kann. Abb. 27 zeigt das Elutionsdiagramm einer Chromatographie an Butyl-Agarose. Man trägt die Durchbruchsfraktion der 2',5'-ADP-Sepharose auf, wäscht mit 50 mM Phosphat, pH 6,6, nach und eluiert mit 50 ml eines linearen Salzgradienten 0-0,4 M NaCl im gleichen Puffer.

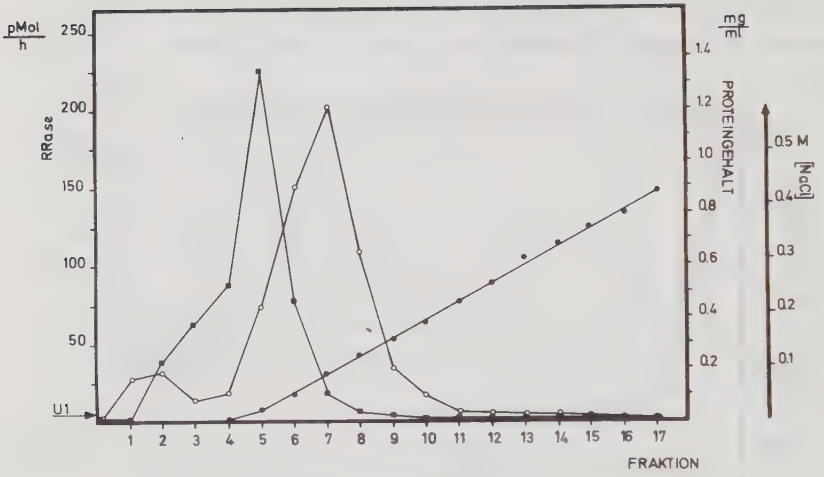


Abb. 27: Hydrophobe Chromatographie von U2 an Butyl-Agarose
Säule: 6,0 x 0,8 cm
Flußgeschwindigkeit 10,6 ml/h; 3,0 ml/Fraktion
(o) Proteingehalt
(■) RRase-Aktivität
(●) NaCl-Konzentration (potentiometrisch bestimmt)
Ul→ Aktivität der separaten Ul-Fraktion

Im Gegensatz zur Gelfiltration findet man hier nur 67 % der eingesetzten Enzymaktivität wieder. Da etwas RRase in den ersten vier Fraktionen - vor der Gradientenelution - gefunden wird, erhöhten wir später die Kapazität der Säule mit dem erwarteten Erfolg von 3 auf 7 ml. Wie man Abb. 27 entnimmt, ist 70 mM NaCl in 50 mM Phosphat, pH 6,6, zur diskontinuierlichen Elution von U2 geeignet.

DEAE-Cellulose

Die Durchbruchsfraktion der ADP-Sepharosetrennung (U2) wird in einem orientierenden Versuch an DEAE-Cellulose (1 x 1 cm) chromatographiert. Man eluiert schrittweise mit jeweils 3 ml 50 mM Phosphatpuffer steigender NaCl-Konzentration und dialysiert. Tabelle 10 zeigt die Resultate der Tests sowie den Proteingehalt der Fraktionen.

Tab. 10: Elution der U2-Untereinheit mit 50 mM Phosphat/NaCl an DE 32

Probe	RRase-Aktivität ($\frac{pMol}{h}$)		Protein(mg/ml)
	ohne Zusatz	in Kombination mit U1	
Durchbruch	3,65	21,7	0,96
Waschfraktion	3,95	19,8	0,96
0,1 M NaCl	23,85	159,3	15,4
0,25 M NaCl	7,15	33,6	4,6
1 M NaCl	7,2	7,2	0,78
U1 Kontrolle	6,5	-	-

100 mM NaCl eluiert mit der Hauptmenge des Proteins 70 % der aufgegebenen Menge an U2, die in Kombination mit U1 eine 5-fache Stimulation erbringt.

Die Trennung mit 50 ml eines linearen 0-200 mM NaCl-Gradienten in 50 mM Phosphat zeigte einen Aktivitätspeak zwischen 40 und 110 mM NaCl, so daß die letztere Konzentration zukünftig zur diskontinuierlichen Elution verwendet wurde.

Hydroxylapatit

An Hydroxylapatit (1 x 1 cm) wird mit einem 50-500 mM Phosphatgradienten/pH 6,6 (50 ml) chromatographiert, die Fraktionen dialysiert und im Kombinationstest mit U1 getestet. Im Elutionsdiagramm (Abb. 28) sind der Verlauf von Enzymaktivität und Proteingehalt dargestellt. Zur Elution von U2 bei diskontinuierlicher Arbeitsweise wählt man 200 mM Phosphat.

Bei allen Trennungsschritten wird also nur ein Aktivitätsgipfel der Untereinheit im Kombinationstest beobachtet; Molekulargewicht und Elutionsverhalten an DEAE-Cellulose und Hydroxylapatit ähneln der B_2-Untereinheit aus E. coli [115]. Im Gegensatz zum dATP-Eluat enthält die Durchbruchsfraktion (U2) keine Kinase- bzw. Phosphotransferase-Aktivität, die aber wiederum durch U1 in den Kombinationstest eingebracht wird.

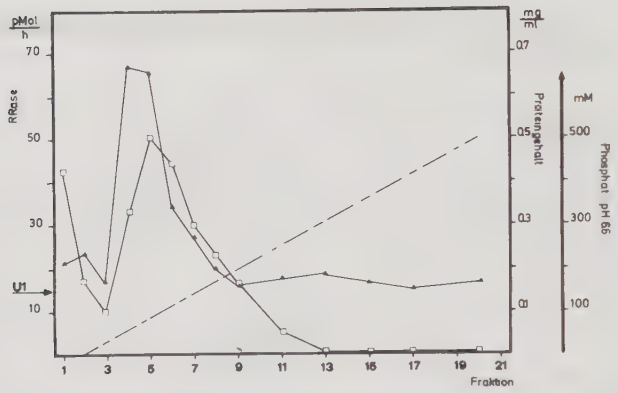


Abb. 28: Chromatographie von U2 an Hydroxylapatit (1 x 1 cm)
Flußgeschwindigkeit: 10 ml/h
2,5 ml/Fraktion
(▲) RRase-Aktivität
(□) Proteingehalt
---- 50-500 mM Phosphat
U1→ Aktivität von U1 alleine

3.3.4.2 Reinigung von U1 an DEAE-Cellulose

Die weitere Reinigung der U1-Untereinheit erwies sich als ungleich schwieriger, denn sowohl nach Gelfiltration an Sephadex G-100 oder Ultrogel-AcA 34 wie auch bei hydrophober Chromatographie an C_2- bis C_{10}-Agarose ließ sich keine Enzymaktivität im Rekombinationstest nachweisen. Trägt man das dATP-Eluat (U1) ohne vorhergehende Abtrennung des Nucleotids auf DEAE-Cellulose oder Hydroxylapatit und eluiert mit einem linearen Salzgradienten, so verschmiert die Enzymaktivität über viele Fraktionen, wobei gleichzeitig dATP im Eluat erscheint. Dialyse mit mehrmaligem Pufferwechsel ist deshalb essentiell. Ungeachtet dieser Maßnahme bleibt die Trennung an Hydroxylapatit unbefriedigend. Auch hier wird U1 über einen weiteren Konzentrationsbereich (50-250 mM Phosphat) mit geringer Ausbeute (ca. 10 %) von der Säule gespült, jedoch kann von Kinaseaktivität abgetrennt werden, die erst bei höheren Ionenstärken eluiert. Die Diskussion des Banden-

musters auf SDS-PAGE erfolgt später im Zusammenhang mit weiteren gelelektrophoretisch charakterisierten Proben.

DEAE-Cellulose

Auftrennung des dialysierten dATP-Eluats mit 50 ml eines linearen Salzgradienten 0-300 mM NaCl/50 mM Phosphat, pH 6,6 an DEAE-Cellulose führt zu dem Aktivitätsprofil in Abb. 29.

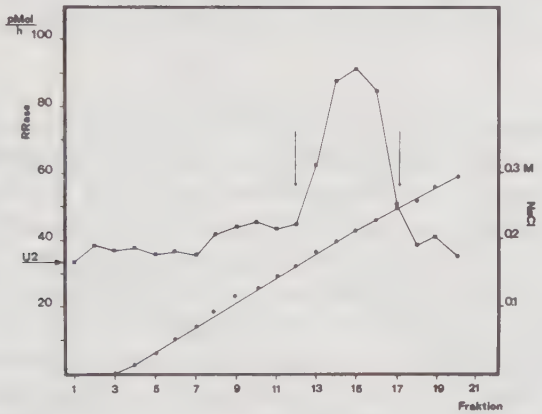


Abb. 29: Chromatographie von U1 an DEAE-Cellulose (1 x 1 cm)
Flußgeschwindigkeit: 10,2 ml/h; 2,5 ml/Fraktion
(■) RRase-Aktivität
(○) NaCl-Konzentration (potentiometrisch bestimmt)
U2→ Aktivität der separaten U2-Untereinheit

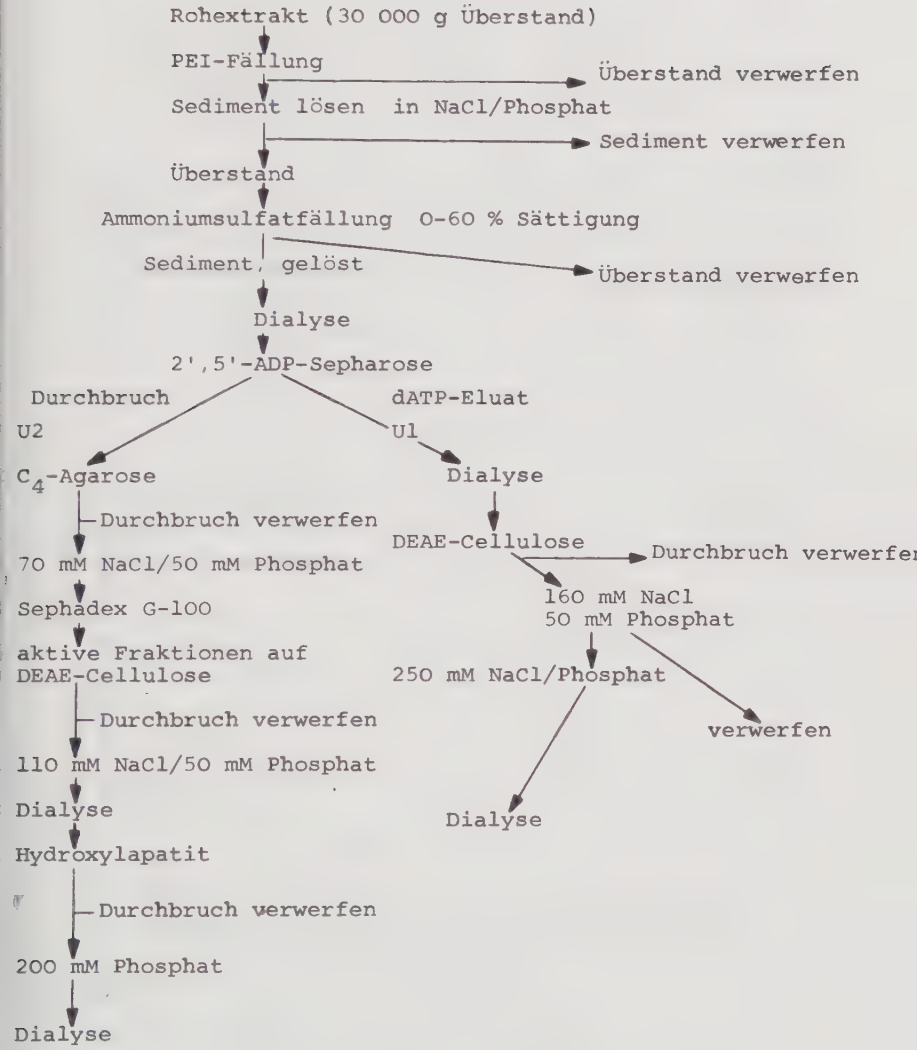
Da nur etwa 300 µg Protein aufgetragen werden, konnte keine verläßliche Proteinbestimmung durchgeführt werden. Extinktionsmessungen belegen die Elution geringer Mengen (bis zu 2 µM) dATP in den Fraktionen 7-10. In diesem Bereich wird vor dem Hauptpeak der Ribonucleotidreduktase noch ein kleinerer gemessen, dessen Lage mit dem eluierten dATP übereinstimmt. Mit der Durchbruchsfraktion werden etwa 2/3 der Kinaseaktivität abgetrennt, so daß im Test der Fraktion 15 nach 60 Minuten Inkubation nur 5 % CTP gefunden werden. Bei der schrittweisen Elution wird mit Standardpuffer/160 mM NaCl zunächst von Fremdprotein abgetrennt und anschließend die Untereinheit U1 mit 250 mM NaCl im gleichen Puffer eluiert.

3.3.5 Kombination der Reinigungsschritte

Ein optimiertes Anreicherungsschema unter Ausnutzung aller bisher beschriebenen Methoden wird in der folgenden Skizze und in Tabelle 11 für zwei Enzympräparationen aus je 4,5 ml pcv Algen wiedergegeben.

Zur Ausbeutebestimmung war die separate Aufarbeitung beider Untereinheiten erforderlich, weil die komplementäre Komponente in möglichst hoher Konzentration und Reinheit zum Test benötigt wird.

Effektivster Trennungsschritt ist die Affinitätschromatographie, die eine 130-fache Abtrennung von Fremdprotein bei 30 % Ausbeute erzielt. Die Verluste von U2 bei der Reinigung sind im Gegensatz zu U1 sicher größer als die Zahlenwerte wiedergeben, da die Enzymaktivität mit dem Verhältnis beider Fraktionen schwankt und von der U1-Konzentration limitiert wird. Eine exakte Ausbeuteangabe wäre nur bei Variation der Mengen beider Untereinheiten in jeder Probe möglich, was angesichts des aufwendigen Tests nicht praktikabel ist. Die Verwendung von Hydroxylapatit (Schritt 12) mußte wegen der zu geringen Ausbeute fallengelassen werden. Bezogen auf den Proteingehalt erreichen wir für U1 eine 5800-fache Anreicherung bei 6 % Ausbeute; für U2 finden wir nach dem DEAE-Celluloseschritt 12 % der Anfangsaktivität wieder und erzielen eine 175-fache Reinigung. Die nähere Charakterisierung und Prüfung der Reinheit anhand von SDS-PAGE der angereicherten Untereinheiten erfolgt unter 3.4.7. Kombiniert man die am weitesten gereinigten Fraktionen 5 (U1) und 11 (U2), so stellt man außer einer geringen Triphosphatbildung (< 10 %/h) keine anderen den Reduktase-Assay störenden Fremdaktivitäten mehr fest. Diese Kombination eignet sich deshalb zur weiteren Charakterisierung der Enzymeigenschaften.


Rohextrakt (30 000 g Überstand)
PEI-Fällung
Überstand verwerfen
Sediment lösen in NaCl/Phosphat
Sediment verwerfen
Überstand
Ammoniumsulfatfällung 0-60 % Sättigung
Sediment, gelöst
Überstand verwerfen
Dialyse
2',5'-ADP-Sepharose
Durchbruch
U2
dATP-Eluat
U1
C4-Agarose
Dialyse
Durchbruch verwerfen
DEAE-Cellulose
Durchbruch verwerfen
70 mM NaCl/50 mM Phosphat
160 mM NaCl
50 mM Phosphat
Sephadex G-100
aktive Fraktionen auf
DEAE-Cellulose
250 mM NaCl/Phosphat
Durchbruch verwerfen
verwerfen
110 mM NaCl/50 mM Phosphat
Dialyse
Dialyse
Hydroxylapatit
Durchbruch verwerfen
200 mM Phosphat
Dialyse

Tab. 11: Reinigung beider Untereinheiten der Ribonucleotidreduktase
Nr. 1-4: Untereinheit U1, Nr. 6-12: Untereinheit U2

Nr.	Probe	Volumen (ml)	Protein (mg)	Umsatz (% dC/h)	RRase-Gesamtaktivität (pMol/h)	Ausbeute %	spez. Aktivität (pMol/h·mg)
1	Rohsaft	66	147,2	0,8	5280	-	36
2	PEI-$(NH_4)_2SO_4$-Dialyse	7,75	27,9	79,0	61225	100	2194
3	ADP-Sepharose b dATP-Eluat	2,75	0,21 [a]	69,5	19112	30,5	91009
4	DEAE-Cellulose b 160-250 mM NaCl	2,55	0,025 [a]	15,3	3901	64	156040
5	U2,(ADP-Sepharose, Durchbruch)	7,05	23,97	0	-	-	-
6	Rohsaft	70	117,6	0,65	4550	-	39
7	PEI-$(NH_4)_2SO_4$-Dialyse	6,9	28,4	55,0	37950	100	1336
8	ADP-Sepharose Durchbruch	5,9	24,7	32,6	19234	50,7	778
9	C_4-Agarose [c]	4,9	7,7	24,7	12103	31,9	1572
10	Sephadex G-100 [c]	19,2	0,94 [a]	6,3	12096	31,8	12868
11	DEAE-Cellulose [c]	3,8	0,67 [a]	12,1	4598	12,1	6862
12	Hydroxylapatit [c]	2,8	0,3 [a]	2,3	644	1,7	2146
13	U1,(ADP-Sepharose, dATP-Eluat)	2,86	0,17	-	-	-	-

Test: 5 µCi CDP = 500 pMol Substrat im Testvolumen von 150 µl
a = Protein durch Extinktionsmessung bei 280/260 nm bestimmt
b = Getestet mit dem gleichen Probenvolumen (50 µl) U2 (Nr. 5)
c = Getestet mit dem gleichen Probenvolumen (50 µl) U1 (Nr. 13)

3.4 Eigenschaften der Ribonucleotidreduktase

3.4.1 Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit der Enzymreaktion

Die Bestimmung des gebildeten Desoxyribonucleotids bei Variation der Enzymkonzentration führt zu dem in Abb. 30 dargestellten sigmoiden Kurvenverlauf mit Sättigung bei limitierender Substratkonzentration (70 % Umsatz). Trägt man dagegen das Probenvolumen bis zu 30 µl quadratisch auf, so ergibt sich annähernd ein linearer Zusammenhang. Eine derartige quadratische Abhängigkeit der Enzymaktivität bei niedriger Enzymkonzentration deutet auf ein Assoziationsgleichgewicht mehrerer Untereinheiten des Enzyms hin und wird auch bei Ribonucleotidreduktasen tierischer Zellen gefunden [6,116-119]. Diese Reaktion zweiter Ordnung geht bei hoher Enzymkonzentration in eine erster bzw. pseudoerster Ordnung über.

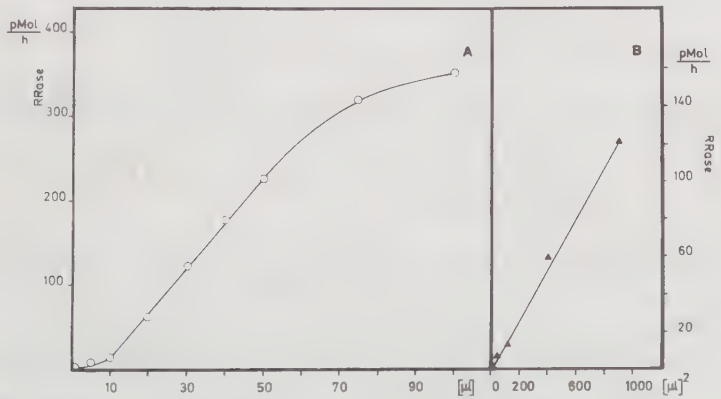


Abb. 30: A. Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

B. Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Quadrat der Enzymkonzentration

Produktbildung als Funktion der Inkubationszeit und Substratkonzentration

Die Zeitabhängigkeit der Reduktasereaktion zeigt zwischen 30 und 90 Minuten einen linearen Verlauf, anfangs jedoch nichtlineares Verhalten (Abb. 31). Exakte Ausbeuteberechnungen auf Grundlage derartiger Kurven, die jedem Test zugrundeliegen, sind deshalb mit prinzipiellen Fehlern behaftet, deren Größe sich im Einzelfall schwer abschätzen läßt.

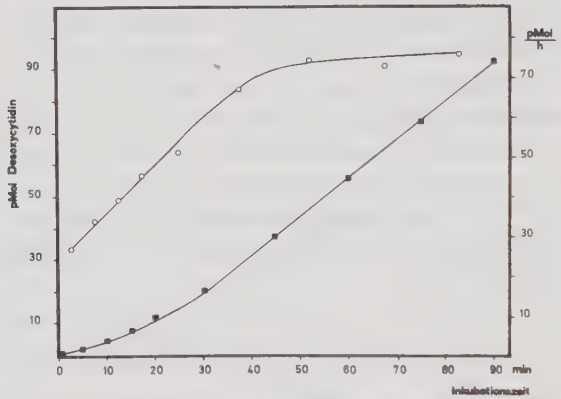


Abb. 31: (■) Zeitliche Akkumulation des Reaktionsproduktes Desoxycytidin
(o) Veränderung der Enzymaktivität mit der Inkubationszeit

Der Zusammenhang wird deutlicher, wenn man die Enzymaktivität als Funktion der Inkubationszeit darstellt (Abb. 31), wobei eine 3-fache Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit erkennbar wird. Eine Deutung des Kurvenverlaufs kann nicht gegeben werden. Diskutabel ist neben der Substrathemmung ein zur Zeit noch nicht durchschaubarer, veränderter allosterischer Einfluß von dATP in Verbindung mit dem Produkt dCDP.

Daß auch Desoxyribonucleosiddiphosphate allosterisch wirksam sind, beweist ein Experiment mit dADP (10 µM), mit dem 76 % des Kontrollwertes mit dATP (10 µM) erreicht werden. Ferner muß bedacht werden, daß auch die Bildungsgeschwindigkeit des katalytisch aktiven Komplexes aus beiden Untereinheiten ggf. erst in Gegenwart von Substrat der zeitlich limitierende Schritt sein könnte. Da sich der Umsatz zeitlich erhöht, ist

eine kinetische Analyse der Ribonucleotidreduktion mittels Michaelis-Menten-Formalismus nicht durchführbar.

Wertet man entweder die Umsatz-Zeit-Kurve zur Berechnung von $\frac{1}{s}$ und $\frac{1}{v}$ aus oder erhöht die Substratkonzentration im Test bis zum 100-fachen mit unmarkiertem CDP, so resultiert im $\frac{1}{v}/\frac{1}{s}$ - Diagramm ein hyperbolischer Kurvenverlauf, dessen Äste sich bei hoher Substratkonzentration der Ordinate asymptotisch nähern (Substrathemmung?); bei niedriger Substratkonzentration finden wir eine zur $\frac{1}{s}$-Achse nahezu parallele oder sich asymptotisch nähernde Kurve.

Temperatureinfluß

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationstemperatur ist in Abb. 32 dargestellt. Das Maximum bei 25 und 30°C entspricht der optimalen Wachstumstemperatur von Scenedesmus (28°C). Die Testtemperatur von 30°C kann beibehalten werden.

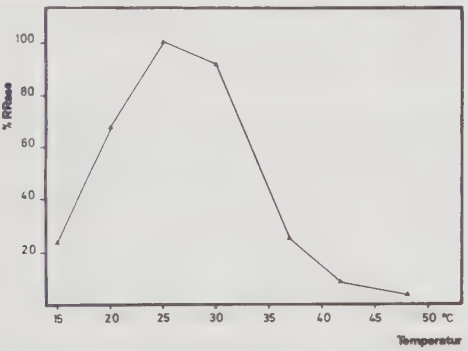


Abb. 32: Temperaturabhängigkeit der RRase-Aktivität (100 % = 515 pMol/h Desoxycytidin)

3.4.2 Substratspezifität

Die Substratphosphorylierungsstufe konnte im Rohhomogenat [15] wegen zahlreicher Konkurrenzreaktionen nicht eindeutig zugunsten des Nucleosiddi- oder Triphosphats entschieden werden. Inkubiert man die tritiummarkierten Nucleotide CMP, CDP und CTP unter identischen Bedingungen, entnimmt dem Testgemisch zu definierten Zeiten Proben und bestimmt den Desoxyribonucleotidgehalt, so ergibt sich die in Abb. 33 dargestellte Produktbildung.

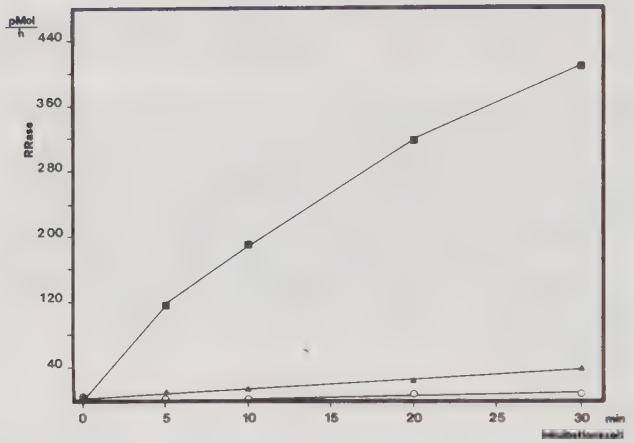


Abb. 33: Produktbildung in Abhängigkeit von der Phosphorylierungsstufe

(▲)	Cytidintriphosphat	500 mCi/mMol
(■)	Cytidindiphosphat	10 Ci/mMol
(o)	Cytidinmonophosphat	21 Ci/mMol

Testvolumen: 150 µl; Substrat: Je 5 µCi

Cytidindiphosphat wird gegenüber dem Triphosphat elfmal rascher umgesetzt und ist somit zweifelsfrei als Substrat der Ribonucleotidreduktase identifiziert. Eine dCMP-Bildung kann dagegen nicht gemessen werden.

Die Kurvenform der dCDP-Bildung in Abb. 31 unterscheidet sich von der hier gemessenen. Ursache ist die etwa 15-fach höhere Enzymaktivität, die auch geringere Umsätze der Nucleosidmono- und Triphosphate erfaßbar machen sollte mit der Folge, daß bereits nach 10 Minuten eine Substratlimitierung eintritt.

Während bakterielle Ribonucleotidreduktase mit Sicherheit alle Ribonucleotide passender Phosphorylierungsstufe als Substrate akzeptiert, wird für tierische Enzyme auch die Existenz mehrerer Enzymproteine (z. B. CDP-Reduktase und ADP-Reduktase) postuliert; die Frage ist jedoch in keinem Fall entschieden. Wir haben die gereinigte Algen CDP-Reduktase auch mit ADP als Substrat getestet. Da nicht anzunehmen ist, daß dATP auch die ADP-Reduktion stimuliert, variieren wir zusätzlich das Effektornucleotid. Eine Gegenüberstellung der Umsätze von ADP und CDP zeigt Tabelle 12.

Tab. 12: RRase-Aktivität ($\frac{pMol}{h}$) von CDP und ADP mit Desoxyribonucleosidtriphosphaten (10 µM) als Effektoren.

Effektor	Substrat ADP	Substrat CDP
ohne	0	180
dATP	0	259
dGTP	4,2	225
dCTP	0	208
dTTP	2,2	325

spez. Aktivität: ADP 15,2 Ci/mMol; CDP 10 Ci/mMol

Mit ADP wird gegenüber CDP bei vergleichbarer Substratkonzentration 1/50 des Umsatzes erreicht, der jedoch ebenso stark von der Art des Effektornucleotids abhängt. Während dGTP die ADP-Reaktion spezifisch begünstigt, wird CDP-Reduktase durch dTTP maximal stimuliert. Der Nachweis der wenn auch geringen ADP-Reduktion zeigt, daß zumindest CDP und ADP von der gleichen - für U1 mehr als 4000-fach angereicherten - Proteinfraktion umgesetzt werden. Dies macht die Existenz mehrerer substratspezifischer Ribonucleotidreduktasen unwahrscheinlich. Die geringe ADP-Reduktaseaktivität kann durch die speziell für CDP optimierten Testparameter (pH, Effektorkonzentration) bedingt sein. Auch speziell den ADP-Umsatz störende Enzymaktivitäten wie Desaminierung zu Inosinderivaten kommen hier in Frage. Beiden Aspekten wurde jedoch nicht weiter nachgegangen.

Abb. 34 zeigt das Elutionsdiagramm der Nucleoside eines ADP-Reduktase-Tests vom Ionenaustauscher. Inosinderivate werden jeweils vor den entsprechenden Adenosinverbindungen eluiert.

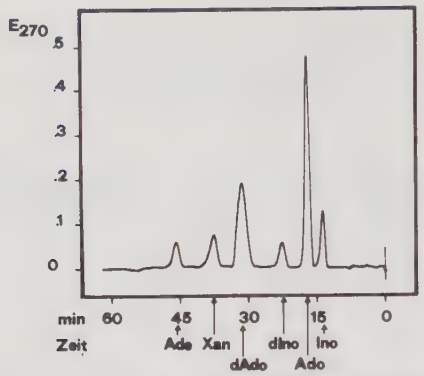


Abb. 34: Trennung eines ADP-Reduktase-Tests
Extinktionsverlauf bei 270 nm

3.4.3 Einfluß von Metallionen

Der entscheidende Unterschied beider bisher bekannten RRase-Typen I und II liegt in ihrem abweichenden Cofaktorbedürfnis [1]. Setzt man verschieden gereinigte Enzympräparationen aus Scenedesmus ein, so beobachtet man in keinem Fall eine Stimulierung durch Coenzym B_{12} (10-50 µM), auch wenn mit CTP als Substrat getestet wird. Da allein die Cobalamin-Beteiligung an der Katalyse über die Einordnung zu Typ II entscheidet, ist die Zugehörigkeit des Algenenzyms zu Typ II sicher auszuschließen.

Die für Typ I-Reduktasen charakteristische Abhängigkeit von Magnesium- und Eisenionen [1,8] soll in einigen Experimenten näher untersucht werden, um einen Vergleich mit den Enzymen aus E. coli T4-Phagen und tierischer Zellen zu ermöglichen. Dies ist umso mehr erforderlich, als Enzyme des Typs I keine homogene Gruppe darstellen, die neben strukturellen und kinetischen Unterschieden auch Differenzen ihres Metallionenbedürfnisses und der Hemmung mit Komplexbildnern aufweist [86].

Abb. 35 zeigt die halblogarithmisch aufgetragene Abhängigkeit der Enzymaktivität von Magnesiumacetat im Bereich von 0-10 mM nach einer Vorinkubation (15 Minuten) beider Untereinheiten mit Magnesium. Wie aus dem Kurvenverlauf ersichtlich, ist gegenüber der Kontrolle keine Stimulation der Enzymaktivität nachweisbar; dagegen nimmt der Umsatz bereits über 10 µM Magnesium sukzessive ab.

Dies steht in völligem Gegensatz zu gleichartigen Experimenten mit anderen RRasen des Typ I, deren Magnesium-Bedürfnis entweder essentiell ist oder sich doch durch eine ausgeprägte Enzymaktivitätssteigerung präsentiert [1,87,115].

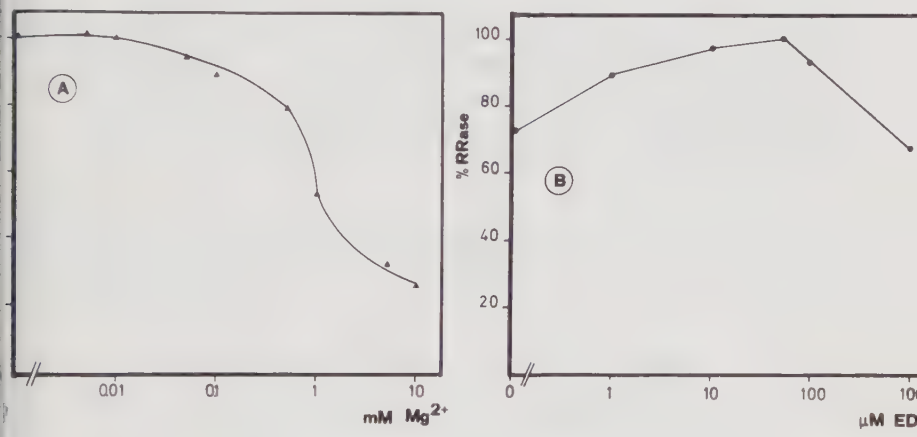


Abb. 35: Abhängigkeit der relativen Ribonucleotid-reduktase-Aktivität von der
A. Magnesiumkonzentration im Test (100 % = 236 pMol/h)
B. EDTA-Konzentration im Test (100 % = 56 pMol/h)

Wie schon erwähnt, ergaben mehrere Versuche mit dem Ziel, beide Untereinheiten simultan durch Gelfiltration und Affinitätschromatographie in Anwesenheit von Magnesium zu eluieren, ebenfalls keinen Hinweis auf ein Magnesiumbedürfnis. In die gleiche Richtung weist ein Experiment in Gegenwart von EDTA, das bis zu 1 mM nicht die zu erwartende Hemmung, sondern sogar eine Stimulierung bis zu 30 % über den Kontrollwert hinaus aufzeigt (Abb. 35B). Ein generelles Fehlen von Metall im Protein kann freilich aus diesen Experimenten noch nicht gefolgert werden.

Nachweis von zwei essentiellen Atomen Nicht-Häm-Eisen ist für die B_2-Untereinheit der E. coli und T4-Phagen Ribonucleotidreduktase gelungen [87,99]. Die Funktion des Metallions scheint dort in der Erzeugung und Stabilisierung eines an der Katalyse beteiligten Tyrosylradikals zu liegen [99]. Dagegen sind in tierischen Geweben bisher nur indirekte Belege für Eisen, nämlich die Stimulierung der Enzymaktivität mit Eisensalzen oder Hemmversuche mit Chelatbildnern bekannt [86]. Besonders bei fortgeschrittener Reinigungsstufe verstärkt sich der Stimulationseffekt; dies weist auf Verluste des Metallions während der Aufarbeitung hin [100].

Variation der Eisenkonzentration im Bereich von 10 µM bis 1 mM führt zu keiner Erhöhung des Umsatzes, sondern bewirkt, wie in Abb. 36 dargestellt, eine Hemmung bis auf 50 % der Ausgangsaktivität.

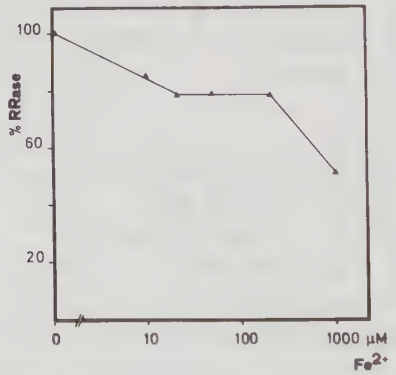


Abb. 36: Ribonucleotidreduktase-Aktivität in Abhängigkeit von der Eisenkonzentration (zugegeben als $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$)

Das Ergebnis des Experiments gibt keinen Aufschluß auf eine Beteiligung von Eisen. Ebenso sollte man eine ausgeprägte Hemmung bei EDTA-Behandlung erwarten, die jedoch - wie in Abb. 35B gezeigt - erst bei höherer Konzentration auftritt und zumindest den Bedarf an freien Eisenionen ausschließt.

Die spezifische Hemmung von Ribonucleotidreduktasen des Typs I mit Hydroxyharnstoff, einer Hydroxamsäure, gilt als gesichert [99]. Man nutzt den Effekt in vivo zur Zellsynchronisatio und Chemotherapie von Tumoren. Der genaue Wirkungsmechanismus konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden.

Diskutiert wird neben der Komplexierung des proteingebundenen Eisens auch die Zerstörung des organischen Radikals sowie neuerdings auch eine Anlagerung an Nucleotidbindungsstellen bei T4-Phagen [101]. Trotz quantitativer Unterschiede ist allen RRasen die Hemmbarkeit in vivo und in vitro gemeinsam. Dies spricht für übergreifende, gemeinsame Strukturelemente.

Das Resultat eines Hemmstoffversuchs mit variabler Hydroxyharnstoffkonzentration im Testgemisch von Scenedesmus-RRase zeigt Tabelle 13.

Tab. 13: Abhängigkeit der RRase-Aktivität von der Hydroxyharnstoff-Konzentration (100 % = 455 pMol/h)

Konzentration (M)	% RRase-Aktivität
0	100
$1 \cdot 10^{-6}$	93
$1 \cdot 10^{-5}$	99
$1 \cdot 10^{-4}$	99
$5 \cdot 10^{-4}$	81
$1 \cdot 10^{-3}$	69

Ein Zusammenhang der in Tab. 13 dargestellten Hemmung und Eisenionen wird in einem weiteren Experiment demonstriert. Nach 30 Minuten Inkubation (0°C) mit 5 mM Hydroxyharnstoff, anschließender Dialyse der Probe sowie gleichzeitig einer unbehandelten Kontrolle gegen Standardpuffer wird die Probe geteilt und zu einer Hälfte 8 µM Fe^{2+} gegeben und getestet (Tabelle 14).

Tab. 14: Hydroxyharnstoff-Behandlung der RRase und Reaktivierung mit Eisen

Probe	RRase-Aktivität $(\frac{pMol}{h})$
Kontrolle (unbehandelt)	198
5 mM HU	131
5 mM HU + 8 µM Fe^{2+}	200

Nach Hydroxyharnstoffeinwirkung sinkt die Enzymaktivität um etwa ein Drittel ab, läßt sich aber mit Eisen wieder vollständig reaktivieren.

Unter der Annahme einer entfernten Ähnlichkeit der E. coli- und Scenedesmus-Ribonucleotidreduktasen sollte man im Absorptions-Spektrum einer Untereinheit - aus Analogiegründen zu E. coli kommt U2 in Frage - ein Maximum bei 410 nm erwarten. Dies korreliert im bakteriellen Enzym (B_2-Untereinheit) unmittelbar mit dem Radikalgehalt, der wiederum die Anwesenheit des proteingebundenen Eisens erfordert [99]. Die nur etwa 170-fach angereicherte Komponente U2 zeigt keine Absorption in diesem Spektralbereich. Dagegen findet man unerwarteterweise im Spektrum von U1 unabhängig von der Art des zur Reinigung verwendeten Affinitätsmaterials (Tab. 9) ein derartiges Extinktionsmaximum, das aber nach dem folgenden Reinigungsschritt an DEAE-Cellulose fehlt (Abb. 37), so daß ein Zusammenhang mit RRase entfällt.

Ebenso bleibt auch die Behandlung mit 1 mM Hydroxylamin und Reaktivierung mit 50 µM Eisenascorbat [99] im Gegensatz zu E. coli RRase-Untereinheit B2 ohne Einfluß auf diesen Spektralbereich. Weitergehende Untersuchungen der getrennten Untereinheiten erschienen bei den gegenwärtig verfügbaren Proteinmengen nicht sinnvoll. Schließlich wurde auch mit anderen Metallionen (Molybdat bis zu 5 mM; Na^+, K^+, NH_4^+) keine stimulierende Wirkung beobachtet.

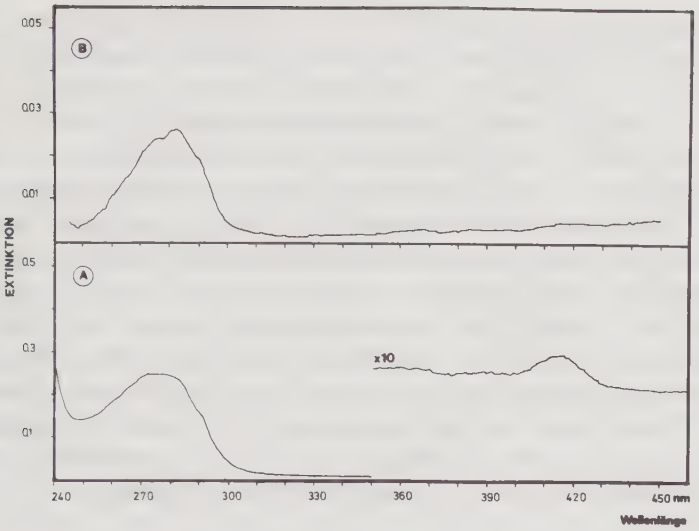


Abb. 37: UV/VIS-Spektrum von U1
A. Nach Elution von ADP-Sepharose mit dATP (350-460 nm um Faktor 10 verstärkt)
B. Nach DEAE-Cellulose-Chromatographie

3.4.4 Thioredoxine als Reduktionsmittel

In allen bislang untersuchten Organismen gelten Thioredoxine als unmittelbare Reduktionsmittel der Ribonucleotidreduktion in vivo. Daneben fand Holmgren in "Glutaredoxin" ein zweites Cosubstrat der E. coli- und T4-Phagen-Ribonucleotidreduktase, das nichtenzymatisch von reduziertem Glutathion regeneriert wird. Die Wechselbeziehung beider Systeme mit RRasen ist noch unklar [120,121].

Aus Analogiegründen erwartet man auch für Scenedesmus-RRase Thioredoxin als Cosubstrat und Reduktionsmittel in vivo. Neben dem direkten Nachweis (s. u.) ist es als Indiz zu werten, daß Dithiothreit als essentielles Dithiol im Test dient, das im Vergleich zu Monothiolen (Glutathion, 2-Mercaptoethanol) bereits im Rohhomogenat höhere Umsätze bewirkt [15]. Wagner wies eine Population von drei Thioredoxin-Species in Scenedesmus nach: Ein größeres, vermutlich chloroplastidäres Thioredoxin A (MG: 23 500) und zwei kleinere, BI und BII, wahrscheinlich cytoplasmatischen Ursprungs (MG: 12 600) [18].

Da heterologe Thioredoxine in der reduzierten Form meist von verschiedenen Thioredoxin-abhängigen Enzymen akzeptiert werden [1,18], ist zu erwarten, daß auch Scenedesmus-RRase mit Thioredoxinen verschiedener Herkunft kreuzreagiert. Für das folgende Experiment wurden dankenswerterweise Proben der Thioredoxine aus E. coli, der Hefe S. cerevisiae, aus Scenedesmus obliquus (BI und BII) und der Blaualge Synechococcus 6301 von den Herren Dr. W. Wagner, M. Zenke und Prof. A. Schmidt, München, zur Verfügung gestellt. Das Testprinzip nutzt den Umstand, daß der K_m-Wert für Thioredoxine niedriger liegt als für DTT, so daß bereits die Zugabe geringer Mengen Thioredoxin zur Stimulation der Enzymaktivität führt. Die DTT-Konzentration wird deshalb auf 1 mM verringert, um einen möglichst niedrigen Blindwert allein mit DTT als Reduktionsmittel zu erhalten. Die Auswertung der Tests führt zu den in Abb. 38 dargestellten Kurven.

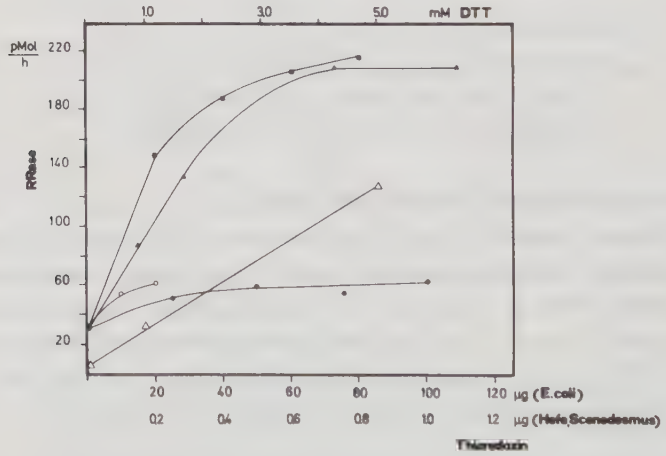


Abb. 38: Abhängigkeit der RRase-Aktivität (pMol/h) von Thioredoxinen verschiedener Organismen
22 µg Enzym, 30 min, in Gegenwart von 1 mM DTT
(▲) E. coli 2,9 mg/ml
(■) Hefe 20 µg/ml
(●) Scenedesmus obliquus BI - BII (25 µg/ml)
(○) Synechococcus (Gehalt nicht bestimmt)
(△) Kontrolle mit DTT

Eine wenn auch unterschiedliche Stimulierung der Kontrollaktivität erfolgt mit allen Proben. Dies zeigt, daß Scenedesmus-RRase auch heterologe Thioredoxine als Cosubstrate akzeptiert. Hefe- und E. coli-Thioredoxin bewirken einen starken Anstieg der Enzymaktivität verbunden mit dem typischen Sättigungsverhalten und führen wenn auch mit unterschiedlicher Konzentration in beiden Fällen zu siebenfachem Aktivitätszuwachs. Dagegen erreicht überraschenderweise die homologe Proteinmischung (Thioredoxin BI, BII) nur eine Verdoppelung des Ausgangswertes; trotzdem findet man auch hier einen Sättigungsbereich der Thioredoxine. Die verfügbare Menge des Synechococcus-Thioredoxins reichte nicht aus, um eine Konzentrationsabhängigkeit über einen weiten Bereich zu bestimmen. Aus den Meßpunkten lassen sich K_m-Werte ermitteln, die für Hefe-Thioredoxin bei $0.1 \cdot 10^{-6}$ M und E. coli bei $1{,}4 \cdot 10^{-5}$ M liegen.(E. coli-Thioredoxin war in 100-fach höherer Konzentration angewandt.) Dagegen kann im Falle von BI und BII kein sinnvoller Wert angegeben werden. Testet man im Rohhomogenat mit verschieden weit gereinigten RRase-Präparationen in Gegenwart von NADPH oder NADH, so findet man keine Aktivität, so daß ein direkter Wasserstofftransfer nicht in Betracht kommt.

3.4.5 Kombination der Untereinheiten mit RRase aus E. coli

Da es gelingt, Scenedesmus-RRase in zwei Untereinheiten aufzutrennen, sind heterologe Kombinationsexperimente mit den Untereinheiten des Enzyms aus E. coli möglich, die ebenfalls in gereinigter Form verfügbar sind [102]. Ziel dieses Experimentes ist festzustellen, ob solche "Hybride" enzymatisch aktiv sind. Da das bakterielle Enzym Magnesiumionen zur Aktivität benötigt, sind zwei Testreihen - mit und ohne Magnesium - durchzuführen. Die eingesetzten Untereinheiten U1 und U2 waren an 2',5'-ADP-Sepharose getrennt, jedoch zu diesem Experiment nicht weitergereinigt. Tabelle 15 zeigt die einzelnen Umsätze.

Tab. 15 Kombinationstests der getrennten RRase-Untereinheiten aus E. coli und Scenedesmus obliquus mit und ohne Magnesium

Test Nr.	RRase-Untereinheit Scenedesmus	E. coli	5 mM Mg^{2+}	RRase-Aktivität ($\frac{pMol}{h}$)	Stimulationsfaktor
1	U 1			4,4	
2	U 2			2,4	
3	U 1 + U 2			382	56,2
4		B 1		7,5	
5		B 2		2,0	
6		B 1 + B 2		156	16,4
7		B 1	+	73	
8		B 2	+	3,4	
9		B 1 + B 2	+	860	11,3
10	U 1	B 1		2,0	
11	U 1	B 2		15,0	2,3
12	U 1	B 1	+	28	
13	U 1	B 2	+	3,5	

In den meisten Fällen ist keine Stimulation des Umsatzes gegenüber den reinen Komponenten festzustellen, aber eine leichte Inhibierung. Die Ausnahme ist Ul (Secenedesmus) + B 2 (E. coli) mit einer mehr als additiven (etwa doppelten) Umsatzsteigerung in Abwesenheit von Mg^{2+} (Exp. 11); die umgekehrte Kombination U2 + Bl bleibt inaktiv.

3.4.6 Kombination homologer Untereinheiten

Ribonucleotidreduktase-Aktivität tritt während der S-Phase des Zellzyklus von Scenedesmus auf. Der peakförmige Aktivitätsverlauf kann durch Aktivierung von Enzymvorstufen, durch Neusynthese beider oder nur einer Untereinheit während dieses Zeitraums zustandekommen. Im letzteren Fall müßte eine Untereinheit des gesamten Zellzyklus zur Verfügung stehen, während die andere nur während der S-Phase synthetisiert wird und die Kombination beider Proteine dann in vivo zur katalytischen Aktivität führt. Diese Alternativen müßten sich durch homologe Mischungsexperimente mit Proteinen von verschiedenen Zeitpunkten

s Zellzyklus prüfen lassen. Man arbeitet daher Scenedesmus-
llen aus der 4. Stunde des Zellzyklus (ohne5-FdUrd) auf, die
ine Enzymaktivität im Rohhomogenat zeigen. Um auszuschließen,
3 durch Fällungsschritte eine Untereinheit verloren geht,
llt man das Rohhomogenat lediglich mit Ammonsulfat (60 %
ttigung), dialysiert und trennt an ADP-Sepharose. Zum
tivitätstest kombiniert man jeweils mit der komplementären
tereinheit, die aus einer parallel durchgeführten Präparation
s 5FdUrd-stimulierten Zellen der 22. Stunde stammt (Tabelle 16).

b. 16: Kombination getrennter RRase-Untereinheiten der 4. und 22. Stunde (5FdUrd-behandelt) des Zellzyklus

st	Probe		RRase Aktivität
r.	4. h	22. h	$(\frac{pMol}{h})$
	U1		0
	U2		2,3
	U1 + U2		2,1
		U1	4,4
		U2	2,4
		U1 + U2	381,0
	U1	U2	9,5
	U2	U1	6,4

de der 4 Proteinfraktionen zeigt separat getestet nur geringe
zymaktivität. Der hohe Kontrollwert von Exp. 6 stellt sicher,
3 sich beide Untereinheiten zur 22. h als "Titersubstanzen"
gnen. Dagegen findet man in Test 3 erwartungsgemäß keinen
satz. In den beiden Kombinationen 7 und 8 ergibt lediglich
st 7 äußerst geringe Aktivität von 9,5 pMol/h (1 % Umsatz).
n nochmals durchgeführter Versuch zeigte das gleiche Resultat:
nen gerade noch meßbaren U1-Gehalt zur 4. Stunde des Zellzyklus.
wohl Meßfehler auszuschließen sind, läßt sich eine so geringe
satzsteigerung nur schwer als physiologisch signifikant
erpretieren, da die Störmöglichkeiten gerade bei sehr
ringen Umsätzen vielfältig sind. Deshalb scheinen wesentliche
halte von U1 oder U2 alleine zur 4. Stunde nicht vorzuliegen.

3.4.7 Charakterisierung von U1 und U2

Die zur Enzymaktivität essentiellen Komponenten U1 und U2 wurden bisher nicht näher charakterisiert. Um auszuschließen, daß eines der Proteine mit Thioredoxin identisch ist, beläßt man beide zunächst 5 Minuten bei 60°C, kühlt ab und testet in Kombination mit der komplementären Untereinheit. Aus diesem Umsatz und dem Kontrollwert mit unbehandeltem Protein ermittelt man den Aktivitätsverlust. Während U2 40 % einbüßt, verliert U1 nahezu 90 % der Aktivität. Ein Thioredoxin müßte unter diesen Bedingungen völlig stabil geblieben sein; ferner spricht das Molekulargewicht von etwa 80 000 gegen Thioredoxin. Schließlich unterbleibt mit beiden Untereinheiten die Aktivierung von Fructose-1,6-bisphosphatase aus Spinatchloroplasten [18]. (Für die Durchführung der Messungen danke ich Herrn Dr. W. Wagner.) Die Identität einer Untereinheit mit Thioredoxin kann also ausgeschlossen werden.

3.4.7.1 Molekulargewichtsbestimmungen und Sedimentationsgeschwindigkeit

Das Molekulargewicht der Untereinheit U2 wurde durch Gelfiltration auf einer mit Eichproteinen kalibrierten Sephadex G-100-Säule bestimmt. 2 ml der Durchbruchsfraktion U2 von 2',5'-ADP-Sepharose wurden mit 20 ml/h chromatographiert. Aus der Eichkurve, in der das Elutionsvolumen gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes der Eichproteine aufgetragen ist, folgt für U2 ein Molekulargewicht von 76 000 (Abb. 39).

Untersuchungen der RRasen aus E. coli, Kalbsthymus, Rattenleber, Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und menschlichen Zellen ergaben Änderungen des Sedimentationsverhaltens durch allosterisch wirksame Nucleotide, besonders dATP, aber auch Magnesiumionen, Saccharose oder durch unterschiedliche Proteinkonzentration [103,104]. Daher erscheint es unangebracht diese Methode zur verläßlichen Molekulargewichtsbestimmung heranzuziehen. Dagegen sind Zentrifugationsexperimente geeignet, die Dissoziation in Untereinheiten zu beurteilen. Die Größe der Gleichgewichtskonstanten beeinflußt sowohl Form als auch Position der Aktivitätspeaks beider Komponenten.

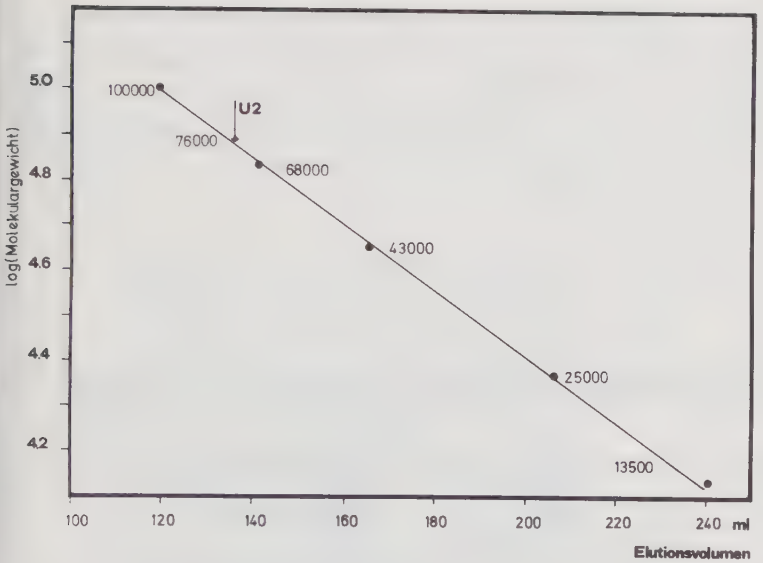


Abb. 39: Molekulargewichtsbestimmung der RRase-Untereinheit U2 durch Gelfiltration an Sephadex G-100 (60x2,5 cm) Eichproteine: Alk. Phosphatase (M_r = 100 000), BSA (68 000), Ei-Albumin (43 000), Chymotrypsinogen (25 000), Cytochrom c (13 500). Der Pfeil kennzeichnet die Elution von U2.

Ohne Dissoziation erwartet man nur einen Aktivitätsgipfel, der beide Untereinheiten enthält. Dissoziiert dagegen der katalytisch aktive Komplex vollständig in U1 und U2, so sollten bei genügend langer Zentrifugation zwei getrennte Aktivitätsmaxima im Kombinationstest meßbar sein, wenn sich die Sedimentationskonstanten genügend unterscheiden. Ein Saccharosegradient von 5-20 % wird mit 0,1 ml einer teilgereinigten RRase-Probe (nach PEI/$(NH_4)_2SO_4$-Fällung) überschichtet, 15 Stunden bei 40 000 Upm zentrifugiert, fraktioniert und die Enzymaktivität in drei Meßreihen (ohne Zusatz und jeweils mit U1 bzw. U2 kombiniert) bestimmt.

In Abbildung 40 sind die Enzymaktivitätsprofile neben der Saccharosekonzentration und der Position von LDH als Markerprotein dargestellt.

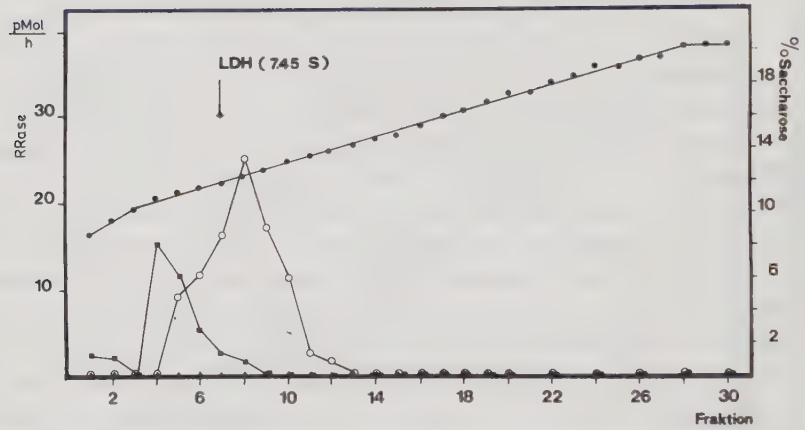


Abb. 40: Sedimentationsgeschwindigkeitszentrifugation von RRase
(▲)ohne Zusatz
(o)zur Bestimmung von U1: supplementiert mit U2
(■)zur Bestimmung von U2: supplementiert mit U1
(●)% Saccharosekonzentration
LDH: Lactatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel als Marker (M_r = 140 000)

Beide vollständig getrennten Untereinheiten sind im Kombinationstest nachweisbar und lassen sich aufgrund der Testzusammensetzung zweifelsfrei identifizieren. Dagegen tritt ein katalytisch aktiver Komplex der Untereinheiten unter diesen Bedingungen nicht auf. Die nach Martin und Ames [65] berechneten Molekulargewichte für U1 mit 170 000 (8,5 S) und U2 mit 65 000 (4,3 S) sind Näherungswerte, wie die Abweichung von 76 000, dem im Gelfiltrationsexperiment bestimmten Wert für U2, zeigt. Es gelingt jedoch erstmalig die Größenordnung des Molekulargewichtes von U1 abzuschätzen, das bei 170 000 liegt.

3.4.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Fraktionen beider Untereinheiten werden zur Überprüfung ihrer Reinheit und ggf. zur Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Abbildung 41 zeigt die angefärbten Proteinbanden einiger Proben.

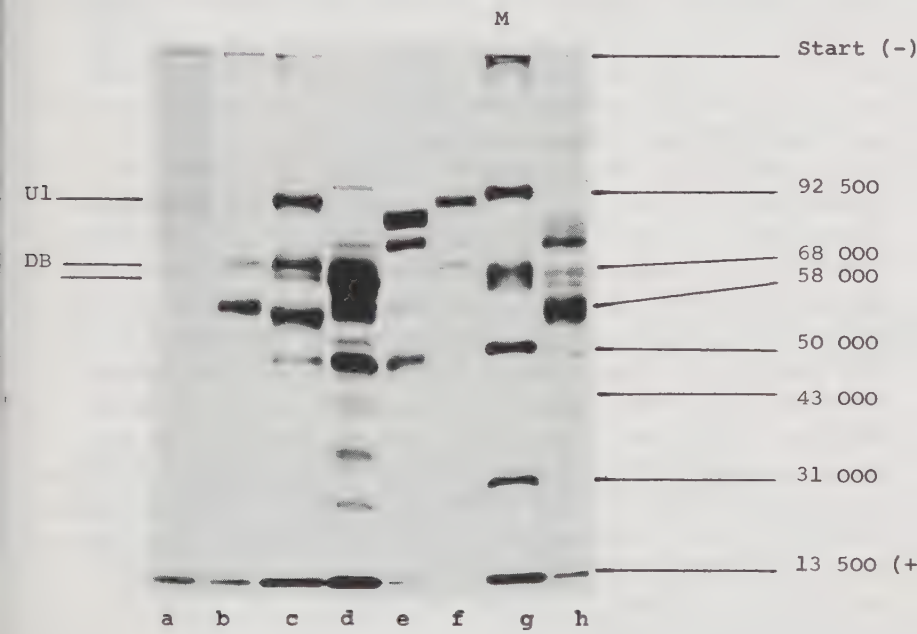


Abb. 41: SDS-PAGE (8 %) beider RRase-Untereinheiten
(a) U1 von ADP-Sepharose/Hydroxylapatit
(b) U1 von dATP-γP-Sepharose; 18. h des Zellzyklus mit 5-FdUrd*
(c) U1 von dATP-γP-Sepharose; 11. h des Zellzyklus ohne 5-FdUrd*
(d) U1 von ADP-Sepharose; 4. h des Zellzyklus
(e) B1-Untereinheit von E. coli-RRase
(f) U1 von ADP-Sepharose/DEAE-Cellulose
(g) Referenzproteine: Phosphorylase a (M_r = 92 500), BSA (68 000), Katalase (58 000), Fumarase (50 000 Ei-Albumin (43 000), Carboanhydrase (31 000), Cytochrom c (13 500) (M = Markerproteine)
(h) U2 nach DEAE-Cellulose (175-fache Reinigung)

Die Auftrennung der Untereinheit U2 (h) zeigt eine Vielzahl von Banden, so daß eine sinnvolle Interpretation nicht gelingt.

U1 konnte soweit gereinigt werden, daß neben einer Hauptbande nur noch drei weitere geringer Intensität nachzuweisen sind (f). Es ist anzunehmen, daß die intensivste Bande mit der RRase-Untereinheit U1 identisch ist, und zwar aus folgenden Gründen: Alle im Kombinationstest aktiven Fraktionen U1 weisen diese Bande auf (a,b,c,f), nicht aber (d) aus Algen der 4. Stunde des Zellzyklus, denen RRase fehlt (3.4.6). Die Doppelbande (DB) bei höherem Rf-Wert kommt nicht in Betracht, weil sie in (a) fehlt, obwohl dort Enzymaktivität auftritt (3.3.4.1). Die Häufung der Proteine in (d), z. B. gegenüber (c), ist dadurch bedingt, daß vor der Affinitätschromatographie nur mit Ammonsulfat gefällt wurde, d. h. die Differenz wird im wesentlichen durch die PEI-Fällung bewirkt. Das Bandenmuster (b,c) von U1 mit und ohne 5FdUrd zur 11. h und 18. h des Zellzyklus bleibt ohne signifikante Abweichungen unverändert. Aus der Intensitätsverteilung (Abb. 42A) der Trennung (f) als Densitogramm und einer Eichgeraden (Abb. 42B), die aus der Position der Referenzproteine (g) und dem Logarithmus der Molekulargewichte resultiert, folgt, daß die Hauptkomponente mit 54 % des Gesamtproteins ein Molekulargewicht von 90 000 aufweist. Trennung (e) zeigt zum Vergleich die Trennung einer affinitätschromatographisch gereinigten B1-Untereinheit aus E. coli [102] mit Molekulargewicht 78 000.

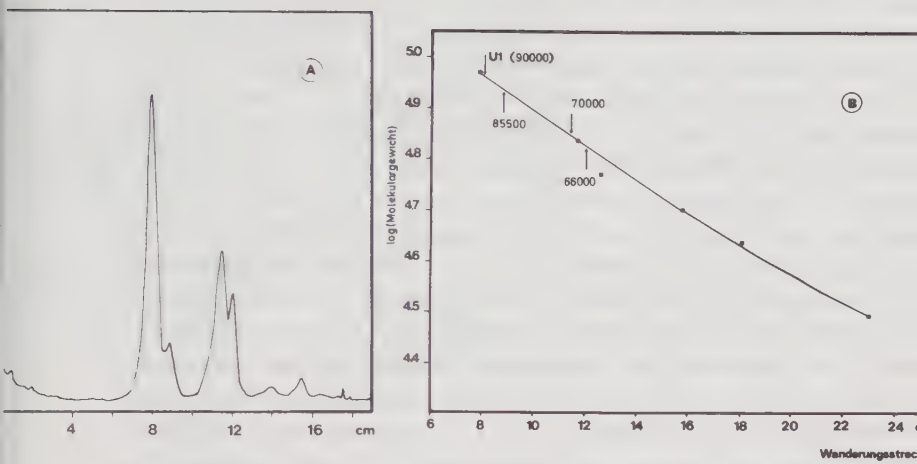


Abb. 42: SDS-Gelelektrophorese der Untereinheit U1
A: Densitogramm der gereinigten Untereinheit U1 bei 578 nm
B: Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteinkomponenten U1;
Referenzproteine: Phosphorylase a (M_r = 92 500), BSA (68 000), Katalase (58 000), Fumarase (50 000), Ei-Albumin (43 000), Carboanhydrase (31 000)

3.5 DNA-Polymerase-Aktivität in gereinigter RRase-Untereinheit U2

Neben RRase fand Elford weitere drei Enzyme des Desoxyribonucleotidstoffwechsels an Membranfragmenten tierischer Zellen und schloß auf die Existenz eines Multienzymkomplexes für die DNA-Vorläufersynthese [23]. Ein weiteres Beispiel der engen Assoziation desoxyribonucleotidumsetzender Enzyme in vitro ist die Nucleosiddiphosphatkinase-Aktivität in RRase aus E. coli [78]. Das gleiche Phänomen finden wir in Präparationen von Scenedesmus RRase-Untereinheit U1: selbst die am weitesten gereinigte Fraktion enthält geringe Diphosphatkinase-Aktivität.

Ob erst die Reinigungsprozedur eine Assoziation bedingt oder ob tatsächlich funktionelle Assoziation in vivo besteht, kann nicht geklärt werden. In gereinigten RRase-Präparationen wurde deshalb auch auf DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität getestet. In Gegenwart von Poly[d(A-T)] oder nativer und "nicked" Thymus-DNA-Matrizen katalysiert der dialysierte 30 000 g-Überstand 3400 cpm [^{3}H]dTTP-Einbau in säurefällbares Material/Stunde Inkubation. Der Einbau ist dem Probenvolumen proportional, also einer Enzymaktivität zuzuschreiben. Nach 7-facher Reinigung des Rohextraktes mit PEI-$(NH_4)_2SO_4$-Fällung erhält man eine DNA-Polymerase-Aktivität, die sich bei der Trennung der RRase-Untereinheiten an ADP-Sepharose im Verhältnis 5:1 auf Durchbruchsfraktion und dATP-Eluat verteilt (47 600/9850 cpm). Kombination beider Lösungen führt im Gegensatz zur RRase-Aktivität zu keiner weiteren Stimulation des Polymerase-Umsatzes. Die Hauptaktivität des dTTP-Einbaus im Durchbruch wird an Butyl-Agarose, Sephadex G-100, DEAE-Cellulose und Hydroxylapatit stets zusammen mit U2-Aktivität chromatographiert.

Ersetzt man Tris-Puffer durch Kaliumphosphat, so bewirkt dies eine weitere Erhöhung des Umsatzes auf das 4,5-fache (1,65 x 10^5 cpm). Die Stimulierung des dTTP-Einbaus durch monovalente Kationen ist in dieser Größenordnung für eukaryotische DNA-Polymerasen bekannt. Tabelle 17 faßt die Meßwerte zusammen:

Tab. 17: DNA-Polymerase-Aktivität (cpm) bei Co-Chromatographie mit RRase-Untereinheiten U1 und U2

Nr.	Fraktion	Polymerase-Aktivität (cpm)	ml	Gesamtaktivität (cpm x 10^3)
1	Rohsaft*	3376	67	4520
2	PEI-$(NH_4)_2SO_4$*	1531	8,8	269
3	ADP-Sepharose (Durchbruch) U2	128	18,6	47,6
4	ADP-Sepharose (dATP-Eluat) U1	394	1,25	9,85
5	Hydroxylapatit U2	640	2,8	35,8
6	Hydroxylapatit U2 in Kaliumphosphat	2950	2,8	165

*Separate, nicht unmittelbar vergleichbare Aufarbeitung

3.6 Beeinflussung der Enzymaktivität in vivo

Der RRase-Aktivität stimulierende Effekt von 5-FUra und 5-FdUrd, der zunächst als Hilfsmittel zur Gewinnung höherer Enzymaktivität diente, soll mechanistisch untersucht werden. Die Steigerung der 5FdUrd-Konzentration im Kulturmedium um jeweils eine Zehnerpotenz führt zu einer Dosis-Effekt-Kurve, die bei 10 µg/ml (40 µM) einen sprunghaften Anstieg der RRase-Aktivität im dialysierten Rohhomogenat von nahezu Null auf 150 pMol/h aufweist (Abb. 43).

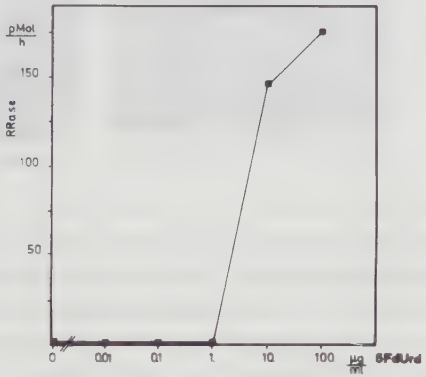
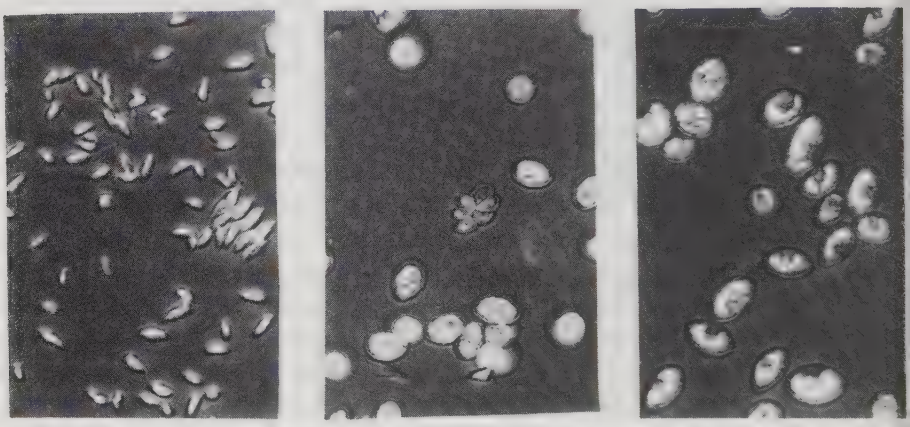


Abb. 43: RRase-Aktivität in Abhängigkeit von der 5FdUrd-Konzentration im Kulturmedium
Zugabe des Nucleosids zur 9. Stunde des Zellzyklus
Ernte der Zellen: 1.5 Stunde des Zellzyklus

Die Steigerung der Enzymaktivität spiegelt sich auch in der Morphologie der Zellen wider (Abb. 44). Bei geringer 5FdUrd-Konzentration (< 10 µg) ohne meßbaren RRase-Spiegel ist keine Veränderung der Zellen gegenüber unbehandelten Kulturen erkennbar. Dagegen sind stimulierte Zellen stets teilungsgehemmt, weisen im Licht weiterhin kontinuierliches Zellwachstum auf und führen so zu sehr großen Zellen. Abbildung 44a und b zeigen die minimale und maximale Zellgröße bei autotrophem, synchronem Wachstum zur 0. und 14. Stunde des Zellzyklus im Vergleich zu teilungsgehemmten Zellen der 24. Stunde (44c).



a b c

Abb. 44: Mikroskopische Aufnahmen verschiedener Stadien synchronisierter Zellen von Scenedesmus obliquus
Vergrößerung: 800 fach (Phasenkontrast)
(a) Unbehandelte Kultur zur 0. Stunde des Zellzyklus
(b) Unbehandelte Kultur zur 14. Stunde
(c) 20 µg/ml 5FdUrd in Kulturmedium: Zellen zur 24. Stunde im Licht. Zugabe des Nucleosids zur 9. Stunde

Der Einfluß von 5FdUrd und 5FdUra auf Ribonucleotidreduktase-Aktivitätserhöhung und Teilungshemmung bleibt auch dann bestehen, wenn deren Zugabe vor der S-Phase zur 0. Stunde des Zellzyklus erfolgt. Angriffspunkt beider Inhibitoren im Stoffwechsel ist die Hemmung der Thymidylatsynthetase. Inhibitoren der DNA-Synthese mit anderem Wirkungsort im Metabolismus sollten klären, ob die Hemmung der Thymidylatbildung eine notwendige Voraussetzung zur Steigerung der Enzymaktivität ist oder ob die Hemmung der DNA-Replikation selbst ausreicht.

Die Zugabe der Hemmstoffe erfolgt zur 9. Stunde, die Ernte der im Licht gewaschenen Algen in der 22. Stunde des Zellzyklus.

abelle 18: Einfluß verschiedener Inhibitoren der DNA-Synthese auf RRase-Aktivität

nhibitor	Konzentration im Kulturmedium		Wirkungsort im Metabolismus	% RRase-Aktivität
ontrolle	-	-	-	5,5
FdUrd	10 µg/ml	40 µM	Thymidylatsynthetase	100,0 (304 pMol/h)
FUra	50 µg/ml	385 µM	Thymidylatsynthetase	57,0
etho-rexat	15 µg/ml	60 µM	Dihydrofolatreduktase (C_1-Stoffwechsel)	10,0
-Hydroxy-arnstoff	0,75 mg/ml	10 mM	Ribonucleotidreduktase (?)	1,5
alidixin-äure	50 µg/ml	215 µM	DNA-Gyrase in Prokaryonten	0
ra-C	15 µg/ml	62 µM	DNA-Polymerasen	3,0

ie Tabelle 18 zu entnehmen ist, haben nur die Hemmstoffe eine timulierung der RRase-Aktivität zur Folge, die auch im Thymi-ylat-Stoffwechsel eingreifen. So bewirkt 5FUra, obwohl in ca. O-fachem Überschuß, nur etwas mehr als die Hälfte der Enzym-ktivität wie 5FdUrd. Der Folat-Antagonist Methotrexat, ein emmstoff der Dihydrofolatreduktase, führt zum Absinken des $_1$-Pools der Zelle, der unter anderem die Methylgruppe zur hymidylatsynthese bereitstellt. Methotrexat beeinflußt die TMP-Bildung nur indirekt, verursacht aber auch hier die in ob. 44c dargestellten großen Zellen. Zwar erreicht man mit ethotrexat nur 10 % des Wertes, der mit 5FdUrd resultiert, er Effekt hebt sich aber deutlich von der Kontrolle und den rei weiteren, zur RRase-Aktivierung unwirksamen Inhibitoren o, die zwar den Stillstand der Zellproliferation, nicht aber ie Ausbildung der großen Zellen herbeiführen. In einem separaten xperiment mit Methotrexat zeigte RRase zwar die Steigerung er Aktivität über die 12. Stunde des Zellzyklus hinaus, erreicht oer nicht die hohen Werte wie mit 5FdUrd, auch wenn das Kultur-edium 50 µM Adenosin, 0,5 mM Glycin und 0,5 mM Serin einzeln der in Kombination enthält [71]. Die Zugabe dieser Substanzen urde gewählt, um durch Methotrexat nicht gleichzeitig Protein-iosynthese und Purinbildung zu inhibieren.

Der Einfluß anderer Nucleoside auf RRase-Aktivität, sowie die Wirkung von Inhibitoren der Proteinbiosynthese und die Frage, ob Thymidin oder Desoxyuridin dem Anwachsen der Enzymaktivität entgegenwirken, ist in folgendem Experiment untersucht worden (Tabelle 19). Die Zugabe der induzierenden Agenzien erfolgte zur 9. Stunde, die Zugabe von Hemmstoffen und Nucleosiden zur 14. Stunde. Mit einer Ausnahme (Nr. 9) beläßt man alle Kulturen im Licht und erntet die Algen zur 18. Stunde des Zellzyklus.

Neben 5FdUrd weisen auch mit 5BrdUrd und selbst mit Desoxyuridin behandelte Algenkulturen stark erhöhte RRase-Aktivitäten zur 18. h auf, die mit Teilungshemmung der Zellen (Abb. 44c) verbunden ist. Im Gegensatz zu Desoxyuridin wirkt Thymidin antagonistisch zu 5FdUrd und führt zum Absinken der Enzymaktivität bis zum Kontrollwert. Sowohl das die Proteinbiosynthese hemmende Cycloheximid als auch Löschen des Lichts zur 14. Stunde verhindern ein weitergehendes Ansteigen der RRase-Aktivität um ca. 65 %, während mit Lincomycin, einem Hemmstoff der chloroplastidären Proteinbiosynthese [122,110], nur ein um 10 % verminderter Umsatz gemessen wird. Dies legt cytoplasmatische Ribosomen als Syntheseort beider Untereinheiten nahe. So scheint der durch 5FdUrd stimulierte Aktivitätsanstieg auf kontinuierlicher Neusynthese der RRase zu beruhen.

Tab. 19: Einfluß von Nucleosiden und Inhibitoren der Proteinbiosynthese auf RRase-Aktivität (100 % = 455 pMol/h)

Test Nr.	Zur 9. Stunde Zugabe von	µg/ml	Konzentration (µM)	Veränderung zur 14. Stunde	% RRase-Aktivität (18. Stunde)	Teilungs-gehemmte Zellen
1	Kontrolle		-	-	1,0	
2	5FdUrd	20	80	-	100,0	+
3	5BrdUrd	20	65	-	0,2	
4	5BrdUrd	50	160	-	47,7	+
5	5FdUrd	20	80	+ 1 mM dThd	1,4	
6	5FdUrd	20	80	+ 1 mM dUrd	75,4	+
7	5FdUrd	20	80	+ 10 µg/ml Cycloheximid (36 µM)	33,0	+
8	5FdUrd	20	80	+ 110 µg/ml Lincomycin (270 µM)	90,1	+
9	5FdUrd	20	80	- Licht	37,4	+
10	dUrd	228	1000	-	45,3	+

3.7 Bestimmung der Desoxyribonucleosidtriphosphatpools

Die Ribonucleotidreduktase-Aktivität in vivo wird durch die stationäre Konzentration der Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP) allosterisch beeinflußt. Die Funktion dieser Nucleotide als Regulativ ihrer eigenen Synthese sowie ihre vermutete Rolle als begrenzender Faktor der DNA-Synthese waren Anlaß genug, in synchronisierten Scenedesmus-Kulturen Konzentrationsbestimmungen durchzuführen. Die dNTP-Gehalte schwanken in allen bisher untersuchten Zelltypen zellzyklusabhängig und weisen während der S-Phase Maximalwerte auf. Neben der Gegenüberstellung von Wachstum (pcv), Zellzahl, RRase-Aktivität, Poolschwankungen und DNA-Gehalt ist zusätzlich der Einfluß von 5FdUrd auf diese Parameter zu untersuchen, um für beide Fälle die in vitro gemessene Enzymaktivität mit dem endogenen dNTP-Gehalt in vivo zu korrelieren.

Die für Chlamydomonas angewandte Extraktion der Nucleotide mit 60 %igem Methanol sollte mit den Erfahrungen von Müller [58] an keimendem Weizen kombiniert werden, indem der polymergebundene Komplexbildner Chelex zugesetzt wird, um dem metallkatalysierten Abbau der Desoxyribonucleotide in vitro entgegenzuwirken. Ohne Aufschluß der Algen im Dismembrator ließen sich, wie Vorversuche ergaben (Tab. 20), nur geringe Nucleotidmengen erfassen. Zum Extrakt zugesetztes dATP und dTTP ist unter allen Bedingungen quantitativ wiederzufinden.

Tab. 20: In säurefällbares Material eingebaute Radioaktivität (cpm) als Maßzahl des dATP-und dTTP-Gehaltes aus synchron. Scenedesmus-Zellen der 11. h des Zellzyklus in Abhängigkeit von den Extraktionsbedingungen. Zur Messung werden 20 µl der in TRIS gelösten Nucleotide eingesetzt.

Nr.	Extraktionsbedingungen	dTTP (cpm)	dATP (cpm)
1	+ Aufschluß + Chelex	35 000	88 200
2	+ Aufschluß -	39 400	54 200
3	- Aufschluß + Chelex	190	50
.	- Aufschluß -	110	80

Zu definierten Zeiten werden je 250 ml der synchronen Scenedesmus-Kultur ohne Zusatz und ab der 9. Stunde mit 5FdUrd im Kulturmedium geerntet. Die Bestimmung des pcv, der Zellzahl und der Zellaufschluß zur Nucleotidextraktion von 20 ml Algensuspension ($6.24 \cdot 10^7$ Zellen) erfolgen unverzüglich. Zur Messung des DNA-Gehaltes reichen 10 ml der Kulturlösung ($3,12 \cdot 10^7$ Zellen). Zum Vergleich mit publizierten Werten sind die Poolgrößen auf 10^6 Zellen bezogen. Zusätzlich ist eine Korrektur der Ergebnisse nötig, weil sich die spezifische Radioaktivität im Test durch das gleiche endogene Desoxyribonucleotid verdünnt, so daß ein geringerer Einbau vorgetäuscht wird [111]. Abb. 45 und 46 fassen die Ergebnisse beider Experimente graphisch zusammen.

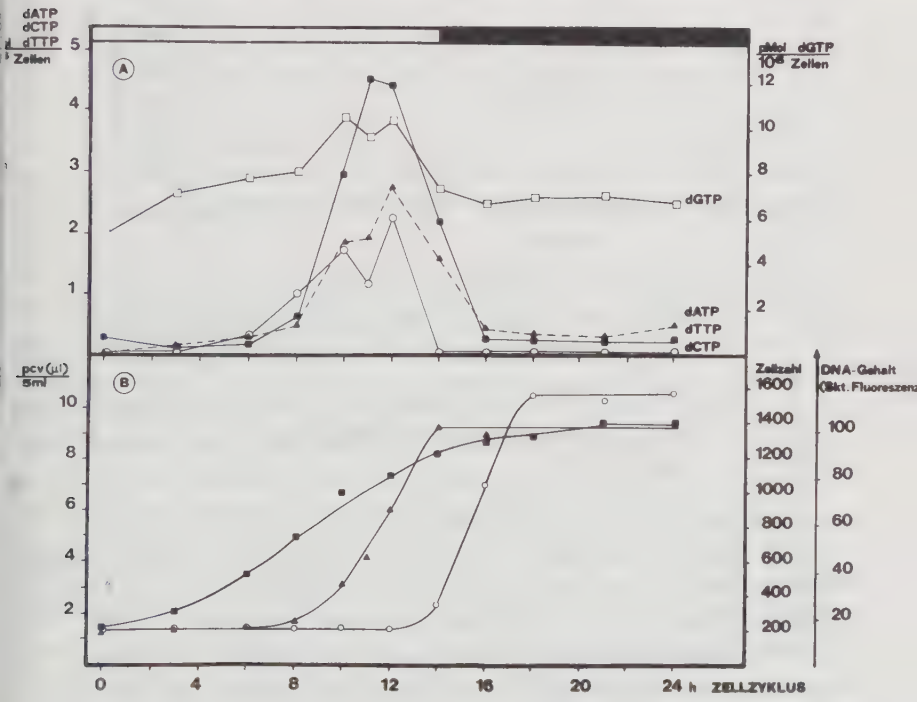


Abb. 45: A. Zellzyklusabhängige Veränderung der dNTP-Pools in einer helldunkelsynchronisierten Scenedesmus-Kultur.

B. Verlauf des Wachstums (pcV) (■), der Zellzahl (O) und des relativen DNA-Gehaltes (▲).

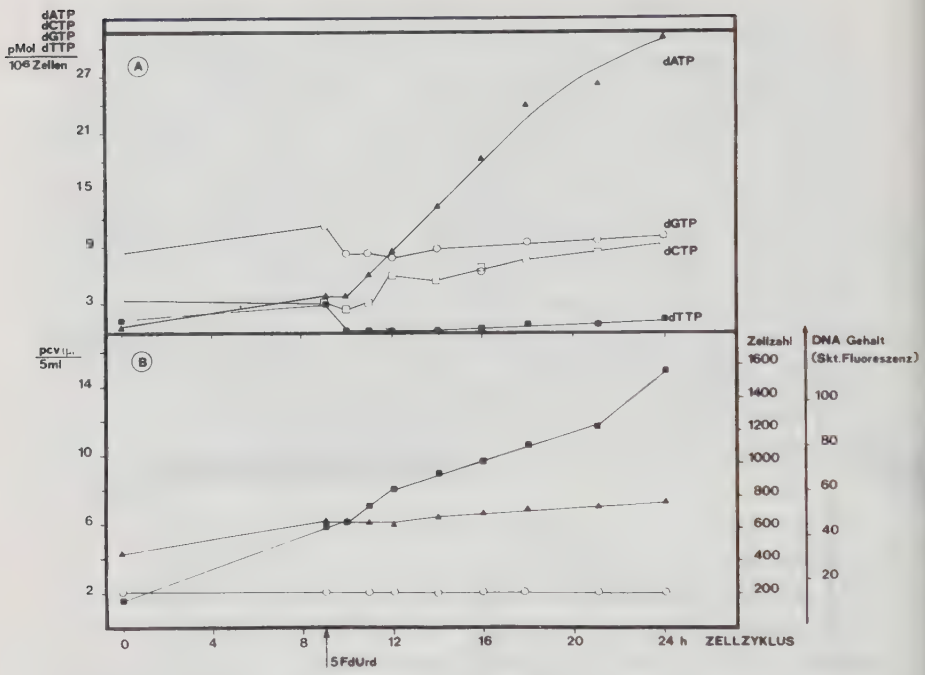


Abb. 46: A. Zellzyklusabhängige Veränderung der dNTP-Pools einer helldunkelsynchronisierten Scenedesmus-Kultur bei Zusatz von 20 µg/ml 5FdUrd zur 9. Stunde

B. Verlauf des Wachstums (pcV) (■), der Zellzahl (O) und des relativen DNA-Gehaltes (▲) in Anwesenheit von 5FdUrd.

Die Verachtfachung des DNA-Gehaltes während der S-Phase (8.-14. Stunde) wie auch Anzahl und Zeitpunkt der Autosporenfreisetzung der unbehandelten Kultur (Abb. 45A) zur 14.-18. Stunde stimmen gut mit anderen Arbeiten überein [39,42,44,113]. Auch der Verlauf von dTTP, dATP und dCTP - nach fallender Konzentration geordnet - zeigt, daß hohe Werte nur während der S-Phase in Koinzidenz mit RRase-Aktivität (Abb. 3) auftreten. Der Nucleotidgehalt während der G1-Phase, 0.-6. Stunde beträgt zwischen 0.1-0.3 pMol/10^6 Zellen, steigt in der S-Phase bis auf 4,3 pMol (dTTP) und fällt anschließend wieder auf Wert

zwischen 0,2 und 0,5 pMol ab. Diese gegenüber der G1-Phase höheren Werte sind vorauszusehen, weil auch der dNTP-Gehalt der Zellvermehrung entsprechend ansteigen sollte. Unerwartet verläuft nur die dGTP-Konzentration, die bereits zur 0. Stunde mehr als 5 pMol ausmacht, zusätzlich eine Steigerung während der S-Phase aufweist und wieder auf ca. 7 pMol absinkt. Simultan zu jeder Testreihe werden Eichwerte mit Desoxyribonucleotiden bekannten Gehaltes gemessen, die trotz eines durch die Poly[d(G-C)]-Matrize bedingten hohen Blindwertes (18 000 cpm) auch für dGTP eine lineare Abhängigkeit bis zu 20 pMol zeigen. Systematische Meßfehler erscheinen damit unwahrscheinlich. Mögliche Ursachen dieses Verhaltens werden unten diskutiert.

Die augenfälligen Auswirkungen der 5FdUrd-behandelten Kultur äußern sich in der kontinuierlichen Zunahme des Zellvolumens (s. auch Abb.44), fehlender Zellteilung und einer geringen, doch stetigen Zunahme des DNA-Gehaltes, freilich ohne den stufenförmigen Verlauf von Abb. 45B. Wie bereits oben festgestellt, weist auch hier dGTP die höchste Konzentration auf. Der vermutete Effekt des 5FdUrd, nämlich Hemmung der Thymidylatsynthetase mit einem Absinken der dTMP-Konzentration in vivo, ist am Abfall des dTTP-Gehaltes zu erkennen. Dagegen steigt der dATP-Gehalt ohne das Abfallen nach der S-Phase weiterhin und weist zur 24. Stunde auf einen Wert von mehr als 30 pMol/10^6 Zellen auf. Dieser Steigerung auf das Zehnfache steht nur eine etwa 4-fache Erhöhung des dCTP-Gehaltes gegenüber. dGTP ausgenommen bietet sich folgende Interpretation der Ergebnisse an: Aufgrund der Hemmung des Thymidylatstoffwechsels wird auf bisher undurchschaubare Weise die Synthese von Ribonucleotidreduktase, die zumindest ADP und CDP umsetzt, dereprimiert oder stimuliert. Die erhöhte Enzymkonzentration führt zur vermehrten Desoxyribonucleotidproduktion unter Bildung von dATP, das allosterisch die Reaktion von CDP inhibiert.

4. DISKUSSION

4.1 Analytik der RRase-Bestimmung

Vorbedingung für eine Enzymreinigung ist ein in angemessener Zeit und Probenzahl durchführbarer Enzymtest. In dieser Hinsicht bereitet der empfindliche radiochemische Nachweis von RRase-Aktivität mehrere Schwierigkeiten. Nicht zu umgehen sind enzymatische Konkurrenz- und Folgereaktionen von Substrat und Produkt, deren Anzahl und Ausmaß sich erst bei fortgeschrittener Enzymreinigung reduziert. Daher muß jeder Teil der Assayprozedur kritisch überprüft werden. Der Abbau der Testmischung mit homogener alkalischer Phosphatase vom Diphosphat zum Nucleosid verläuft selektiv, schonend und rasch. Der Zeitaufwand ist weitgehend unabhängig von der Anzahl der Proben, und identische Inkubationsbedingungen gelten für Cytidin- wie Adenosinnucleotide. Im Gegensatz zu den oft verwendeten undefinierten Mischungen von Schlangengiftenzymen sind bei Verwendung des gereinigten Enzyms aus Kälberdarm keine weiteren kontaminierenden Reaktionen zu befürchten.

Die Methodik zur Substrat-Produkttrennung beeinflußt den Fortschritt der Enzymologie von RRasen entscheidend; besonders der Empfindlichkeit und dem geringen Zeitbedarf kommen hohe Priorität zu. Das hier vorgestellte Verfahren arbeitet wie eine bereits publizierte Methode [46,47] mit einem Kationenaustauscher und Ammoniumborat als mobile Phase, nutzt jedoch darüber hinaus einen programmierten pH-Stufengradienten und automatisiert den gesamten Trennungsablauf, so daß sich folgende Charakteristika des Trennsystems ergeben:

a) Es gelingt, kontinuierlich und reproduzierbar bis zu 30 Proben hintereinander ohne zeitraubendes Regenerieren des Säulenmaterials aufzutrennen.
b) Die Verwendung des pH-Gradienten verkürzt gegenüber isokratischer Arbeitsweise die Analysenzeit einer Trennung auf 60 Minuten und ist somit der HPLC-Methodik vergleichbar. Zusätzlich eluieren auch stark retardierte Substanzen noch als scharfe Peaks in geringem Puffervolumen (< 10 ml).

c) Gleiche Trennbedingungen gelten für alle natürlichen Substrate. Lediglich Uridinderivate erfordern keinen Gradienten, deren Auflösung man durch geringere Elutionsgeschwindigkeit verbessert.
d) Konkurrenz- und Folgereaktionen (^3H_2O-Bildung, Desaminierung, Spaltung der N-Glykosidbindung) sind im gleichen Trennungsschritt mit erfaßbar.
e) Bei den gewählten Bedingungen unterbleiben Isotopenaustausch oder chemische Zersetzung der tritiummarkierten Nucleoside.
f) Die Elution aller Uracil und Cytosinderivate erfolgt blockweise.
g) Das Säulenmaterial ist chemisch inert und eine Säulenfüllung kann nahezu beliebig oft verwendet werden.

In der Chromatographie radioaktiv markierter Substanzen reicht es nicht aus, die für spektralphotometrische Registrierung optimale Auflösung zu erreichen, die bei geringstem Zeitaufwand die Substanzen bis zur Basislinie voneinander abtrennt (sog. 6 σ-Trennung) [129], sondern man strebt noch größere Auflösung, freilich auf Kosten der Analysenzeit, an. Die Trennbedingungen wurden deshalb so gewählt, daß auch geringfügige Überlappung anderer Banden mit Desoxycytidin vermieden wird, weil sonst bei geringen Umsätzen zu hohe Enzymaktivität vorgetäuscht würde.

4.2 Enzymreinigung

Bisher konnten die RRasen aus E. coli, T4-Phagen, L. leichmannii, Corynebacterium nephridii, Euglena gracilis und in einer vorläufigen Mitteilung auch aus Kalbsthymus zur Homogenität gereinigt werden, während aus anderen multizellulären tierischen Organismen nur partielle Anreicherung gelang und ein Pendant aus dem Pflanzenreich gänzlich fehlt [1,8,83,115]. Die Ursache liegt in der besonders geringen Aktivität oder Enzymmenge der meisten Gewebe und der Instabilität der Enzyme, die Isolierungsversuche vereiteln. Eigene Untersuchungen ließen synchronisierte Zellen von S. obliquus als vorteilhaftes Studienobjekt erscheinen, weil es durch Hell-Dunkelsynchronisation und darüber hinaus durch die Stimulierung mit 5-FdUrd und 5-FUra gelingt, die

Enzymmenge in vivo etwa 75-fach gegenüber homokontinuierlichen Kulturbedingungen zu steigern. Es konnte deshalb von wenig biologischem Material ausgegangen werden, denn 10 ml pcv entsprechen 750 ml unbehandelten, homokontinuierlichen und noch mehr im batch-Verfahren gezüchteten Algen.

Erste Experimente wiesen das Algenenzym als Typ I RRase aus, so daß wir uns zur Reinigung an den für E. coli oder Novikoff-Tumorzellen erprobten Methoden orientierten; beide Enzyme sind aus zwei nichtidentischen Untereinheiten aufgebaut. Aber bereits das Verhalten bei pH-Fällung - pH 5,0 führte zur Inaktivierung - ebenso wie die erfolglose Protaminsulfatbehandlung, deuten auf Unterschiede zu RRasen tierischer Herkunft hin.

Auch bei Ammoniumsulfatfällung mit 0-60 % Sättigung weicht das Algenenzym - abgesehen von E. coli - von allen anderen RRasen ab, die schon bei 40 % vollständig ausfallen. Im Rückblick ist der breite Konzentrationsbereich plausibel, denn beide Untereinheiten dissoziieren leicht und können unabhängig voneinander bei verschiedenen AS-Konzentrationen präzipitieren.

Erstmals wurde das basische Fällungsreagenz Polyethylenimin (PEI) erfolgreich zur Reinigung einer RRase anstelle von Streptomycin- oder Protaminsulfat angewendet. Es eignet sich nicht nur zur Entfernung von Nucleinsäuren, sondern dient auch zur Reinigung von sauren Proteinen und Nucleinsäure-Protein-Komplexen. Anreicherungen mehrerer DNA-abhängiger RNA-Polymerasen, Restriktionsendonucleasen oder Ferredoxin mit Hilfe von PEI wurden publiziert [53,91,92,130]. Eine Reinigung läßt sich empfindlich steuern: Bei der Ausfällung durch die Wahl von pH, Proteinkonzentration, Molekulargewicht und Konzentration des Fällungsmittels, der Art und Konzentration des Puffers sowie durch selektives Auflösen des PEI-Proteinkomplexes mit Salzlösungen hoher Ionenstärke. Bei Abhängigkeit von so vielen Parametern gewährleisten allerdings nur exakt eingehaltene Fällungsbedingungen eine hohe Reproduzierbarkeit.

In dem sich anschließenden Ammoniumsulfatfällungsschritt werden PEI-Reste quantitativ vom Protein abgetrennt. Da zwei Proteine gleichzeitig zu fällen bzw. wieder aufzulösen sind und nur mit beiden Untereinheiten enzymatische Aktivität zu messen ist, sinkt der Reinigungserfolg. Dies erklärt den relativ geringen Anreicherungsfaktor von nur 5-10.

Alle weiteren Reinigungsexperimente mit klassischen Methoden blieben erfolglos, auch wenn alle Fraktionen von Trennungen an DEAE-Cellulose oder Gelfiltration rekombiniert werden. Trotzdem ging aus diesen Versuchen hervor, daß das Algenenzym in Analogie zu bekannten eukaryotischen Typ I-RRasen aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sein könnte, weil bei an sich ineffektiven Trennbedingungen an Sephadex G-25, an sehr kurzen DEAE-Cellulosesäulen und großen Probenvolumina nach Zentrifugation im Saccharosegradienten Enzymaktivität gefunden wurde. Es muß sich nach jetzigem Erkenntnisstand hier um unvollständige Auftrennung von U1 und U2 mit Restaktivität gehandelt haben. Die Ursache für den Mißerfolg von Trennungen und Rekombinationsexperimenten liegt einerseits in der geringen Stabilität des Enzyms; sicherlich ist die Untereinheit U1 der empfindlichere Teil, da sie auch einzeln nach Gelfiltration und Test mit aktivem U2 nicht mehr wiederzufinden ist. (Ebenso ist B1 aus E. coli die schwieriger zu handhabende Komponente [115].) Andererseits nimmt die Stabilität von RRasen oft mit sinkendem Proteingehalt stark ab [98,133], so daß auch dieser Effekt bei Gelfiltrationsexperimenten nicht auszuschließen ist. Es bleibt jedoch ungeklärt, weshalb beide Untereinheiten nur bei affinitätschromatographischer Arbeitsweise voneinander trennbar sind und unter Aktivitätserhalt wieder rekombinieren. Auffällig ist, daß die Trennung und Rekombination nach DEAE-Cellulose nicht gelingt, obwohl beide Komponenten einzeln am gleichen Material weiter zu reinigen sind. Gegen die Möglichkeit, daß ein drittes zur katalytischen Aktivität essentielles Protein abgetrennt wird, spricht, daß bei der Reinigung der getrennten Untereinheiten immer nur ein Aktivitätspeak gefunden wird.

Die bei weitem effektivste Reinigungsmethode ist die Affinitätschromatographie an matrixgebundenen Nucleotiden wie dATP, dTTP, ATP, GTP, dGTP und neuerdings auch am Farbstoff Cibacron Blue F3G-A (Blue-Sepharose) [83,86,88,93,119,131,132,139]. Die Bindung der RRase-Untereinheit U1 an dATP-γP- und Blue-Sepharose ist nicht unerwartet, weil dATP im Test schon bei 20 µM allosterisch inhibiert und viele nucleotidbindende Enzyme identische Domänen der Sekundärstruktur mit etwa 120 Aminosäuren, sog. (Di)-Nucleotidfalten besitzen [90,153]. Solche Proteine binden ausnahmslos auch an Cibacron Blue, so daß umgekehrt die Proteinbindung von U1 an den Farbstoff die Anwesenheit dieser Domänenstruktur in Algen-RRase nahelegt [90]. Dagegen ist die Affinität von U1 zu 2',5'-ADP-Sepharose weniger verständlich, da dies Nucleotid eine Teilstruktur von NADP(H) simuliert.

Ein grobes Maß der Bindungsstärke von U1 an die Affinitätsgele ist die Enzymaktivität in der Durchbruchsfraktion, die in der Reihenfolge dATP-γP- < 2',5'-ADP- < Blue-Sepharose < 5'-AMP-Sepharose (Tab. 9) zunimmt. Gleichzeitig zeigt die Affinitätschromatographie, daß die Wechselwirkung beider Untereinheiten nur schwach sein kann, da deren Auftrennung in 10 mM Phosphat leicht gelingt, ohne daß U2 merklich retardiert wird. Leider konnte diese Dissoziation weder mit Magnesium noch bei geringer Ionenstärke zurückgedrängt werden, so daß die affinitätschromatographische Reinigung des gesamten Enzyms aussichtslos ist.

Als Elutionsmittel für U1 ist dATP gegenüber ATP vorteilhaft. Dies bestätigt das Konzept, daß nur ein "biospezifischer" Elutionsschritt eine effektive Reinigung an "general ligands" wie 2',5'-ADP gewährleistet, da etwa 1/3 aller Enzyme Nucleotid-Coenzyme,-Substrate oder -Effektoren zu binden vermag. dATP ist schon bei geringer Konzentration (5 µM) allosterisch wirksam und eluiert U1 größtenteils schon bei 100 µM Konzentration. Zum Vergleich beträgt die minimale Konzentration zur Elution von B1 (E. coli) von dATP-Sepharose 20 µM dATP [132]. Dagegen sind drastische Bedingungen erforderlich, um RRase aus CHO-, Kalbsthymus, Ehrlich Ascites- und Novikoff-Tumorzellen von Blue-Sepharose abzulösen, was entweder nur mit dem monomeren Farbstoff oder DMSO/2 mM ATP bzw. 50-100 mM ATP gelingt,

während 1 mM ATP oder 0,5 mM dATP allein unwirksam bleiben [83,86,88,100,119]. Dies deutet dort auf starke hydrophobe und/oder ionische Bindungsanteile hin, oder aber ATP kann nur schlecht um die dATP-Bindungsstellen des gebundenen Enzyms konkurrieren.

Die weitere Reinigung der getrennten Untereinheiten mußte rasch durchgeführt werden, um die spontane Inaktivierung möglichst auszugleichen. Als minimaler Zeitbedarf ergeben sich 35 Stunden für die gesamte Aufarbeitung. Da nur schwache ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen für den Zusammenhalt beider Komponenten in Frage kommen, ist die hydrophobe Bindung von U2 an Butyl- bzw. Hexyl-Agarose nicht unerwartet und wurde chromatographisch genutzt (s. u.). Die Reinigung von U1 führt insgesamt zur 4330- bzw.175-fachen (U2) Steigerung der spezifischen Aktivität. Eine Übersicht für einige RRasen gibt Tabelle 20 wieder.

Tab. 20: Vergleich der Reinigung einiger RRasen

RRase aus		Erzielte spez. Aktivität (nMol/h·mg)	Reinigungs-faktor	Zur Homogenität gereinigt	Lit.
E. coli	B1	14 400	250	+	115
	B2	84 000	1 475	+	
T4-Phagen		1 816	153	+	133
Knochenmark (Kaninchen)		500	6 200		100
CHO-Zellen		100	48		119
Kalbsthymus*		800	4 000	+	83
Novikoff-Tumor	P1	4 380	675		86
	P2	1 440	117		
Scenedesmus obliquus	U1	156	4 330		
	U2	7	175		
E. gracilis		3 580	597	+	134
L. leichmannii		86 000	22	+	135

* in Anwesenheit eines noch nicht identifizierten "stimulierenden Faktors" getestet

Der geringe Zahlenwert der spezifischen Aktivität des Algenenzyms bildet bei vergleichbarer Reinheit zusammen mit RRase aus Knochenmark das Schlußlicht. Die Angabe für U2 ist allerdings sicher zu niedrig, weil mit Ul im Unterschuß getestet wurde. Eine weitere Ursache könnte in der Instabilität des Enzyms liegen. So erreicht U2 nach G-100 Gelfiltration (Tab. 11) die spez. Aktivität von 13 nMol/h·mg gegenüber 7 nach der darauf folgenden Chromatographie an DEAE-Cellulose. Für diese Stufe wäre deshalb auch der Reinigungsfaktor auf 330 zu erhöhen. Dies zeigt, daß die spez. Aktivität für Algen-RRase als Maßzahl des Reinigungserfolgs wie zu Vergleichszwecken nur schlecht geeignet ist. Die Reinigung konnte nicht bis zur Homogenität beider Untereinheiten weiterverfolgt werden. Ul liegt im SDS-Gel mit 50 %iger Reinheit vor. Außer einer geringfügigen Kinaseaktivität (in Ul) enthalten jedoch beide Fraktionen keine weiteren, den CDP-Reduktasetest störenden Enzyme mehr.

4.3 Enzymeigenschaften

4.3.1 Substratspezifität

Im Gegensatz zu den Enzymen aus E. gracilis und zahlreichen prokaryotischen Blaualgen kann mit Scenedesmus-RRase keine Abhängigkeit des Umsatzes von Coenzym B_{12} beobachtet werden, obwohl Scenedesmus reichlich Vitamin B_{12} enthält. Das Enzym schließt sich vielmehr den Organismen mit Typ I-RRase an und setzt Cytidindiphosphat um. Erst mit weitem Abstand (Faktor 11) folgt Cytidintriphosphat (Abb. 33); dagegen ist eine dCMP-Bildung nicht nachweisbar. Bisher wurde kein Enzym bekannt, das ohne Beteiligung von Coenzym B_{12} Nucleosidmono- oder Triphosphat als Substrat bevorzugt. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand gilt deshalb die Regel, daß Typ I-RRasen Nucleosiddiphosphate umsetzen. Das Verhältnis der drei relativen Reaktionsgeschwindigkeiten schwankt jedoch artabhängig, da die Ergebnisse dieser Experimente stark von dem Ausmaß des enzymatisch katalysierten Phosphatumbaus, also der Reinheit der Präparation, abhängen. Die Aussagekraft der publizierten Werte ist deshalb unterschiedlich, da nur in Einzelfällen die Änderung der Phosphorylierungsstufe kontrolliert wurde [68,138].

ADP wird unter den Bedingungen des CDP-Reduktasetests nur langsam umgesetzt. Hier ist es nötig, zur Optimierung des Umsatzes eine Konzentrationsabhängigkeit aller Effektornucleotide zu ermitteln, für jedes Substrat in vitro auch den optimalen pH-Wert zu bestimmen sowie Art und Ausmaß möglicherweise noch nicht abgetrennter AMP-Desaminase nachzuprüfen. Während ADP im Prinzip als Substrat gelten darf, kann schlüssig erst mit der zur Homogenität gereinigten CDP-Reduktase bestätigt werden, ob alle vier Nucleosiddiphosphate in Scenedesmus von nur einem Enzym umgesetzt werden, wie dies für E. coli, L. leichmannii, E. gracilis und T4-Phagen nachgewiesen ist [1,133,134].

4.3.2 Untereinheitenstruktur

Ribonucleotidreduktase aus Scenedesmus obliquus besteht aus zwei nichtidentischen, nur affinitätschromatographisch trennbaren Komponenten, die alleine keine katalytische Aktivität aufweisen und spontan zum intakten Enzym rekombinieren. Die Bezeichnung und Numerierung der "Untereinheiten" U1 und U2 erfolgt in Anlehnung an RRase aus E. coli (B), Novikoff-Tumor (P) und Knochenmarkzellen (S) [2,6,86].

Wie in allen analogen Fällen wurde die größere Komponente, die an Nucleotid-Affinitätsmaterialien wie dATP-Sepharose bindet, U(ntereinheit)1 benannt. Angesichts des chromatographischen Verhaltens liegt die Zuordnung von U1 als regulatorische, von U2 als katalytische Untereinheit auf der Hand; dies ist jedoch in Zukunft noch genauer zu verifizieren. Beide Untereinheiten sind hitzelabil, und wie bei Novikoff-Tumor (P2) erscheint auch U2 weniger hitzeempfindlich [86]. Keine von beiden ist identisch mit Thioredoxin oder läßt sich weiter auftrennen. Da sie im Saccharosegradienten unabhängig voneinander sedimentieren, scheinen beide Proteine nur schwach aneinander gebunden und im Dissoziationsgleichgewicht mit den freien Komponenten zu stehen. In die gleiche Richtung weist daß sie auch an den verwendeten Affinitätsgelen leicht trennbar sind, und die Enzymaktivität bei geringer Enzymkonzentration vom Quadrat des Proteingehaltes abhängt. Dieses Verhalten fand man auch bei tierischen RRasen mit zwei Untereinheiten [6,117,119].

Ein weiteres Indiz liegt in der empfindlichen Beeinträchtigung der Enzymaktivität durch hohe Ionenstärke. Magnesium ist ohne aktivitätsstimulierenden Effekt und bewirkt im Gegensatz zu E. coli bei Affinitätschromatographie keinen Zusammenhalt der Untereinheiten (s. u.). Aussagen über die Zusammensetzung des katalytisch aktiven U1/U2 Komplexes - etwa aus dem Sedimentationsverhalten im Saccharosegradienten - sind wegen der Dissoziation in die Untereinheiten nicht möglich. Unter den bekannten Enzymen nimmt die Bindung der Untereinheiten in der Reihe T4-Phagen (feste Bindung ohne Magnesiumbeteiligung) > E. coli (Bindung in Gegenwart von Magnesiumionen) > Scenedesmus (lose Bindung, unabhängig von Magnesium) ab [133,154]. Tierische Enzyme besetzen Positionen zwischen T4-Phagen und E. coli. Das Verhalten von U2 an Alkyl-Agarosen weist auf hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche hin, so daß auch der Zusammenhalt im Holoenzym durch hydrophobe Wechselwirkungen denkbar ist. Für diesen Fall erwartet man bevorzugte Bindung der Untereinheiten bei höherer Temperatur, und auch Kältelabilität des Enzyms ist zu erwägen [137]. Zu diesem Aspekt fehlen Untersuchungen mit RRasen. Immerhin fällt auf, daß Scenedesmus-RRase im Test bei 30°C über 90 Minuten ohne meßbaren Aktivitätsverlust nachweisbar ist, während bei 0°C nur eine Halbwertszeit von ca. 40 Stunden besteht. Dieser Frage bleibt nachzugehen.

Ob darüber hinaus ein drittes, nicht essentiellen Protein (oder weitere) existiert, das am Aufbau der RRase in vivo beteiligt ist und als "Kitt" der Komponenten dient, ist ungewiß. Eine solche Funktion wurde jedoch bereits für E. coli, E. gracilis und Kalbsthymus spekulativ erörtert.

Trotz unterschiedlichen Metallionenbedarfs (s. u.) der RRasen aus Scenedesmus und E. coli resultiert bei der Mischung jeweils komplementärer, heterologer Untereinheiten in einem Fall (U1/B2) in Abwesenheit von Magnesium geringe Enzymaktivität, so daß eine wenn auch minimale enzymologische Verwandtschaft beider Enzyme zu postulieren ist. Dies ist unerwartet, da in einem analogen Experiment mit E. coli- und T4-Phagen-RRase weder Enzymaktivität noch immunologische Verwandtschaft festgestellt werden konnte, obwohl beide Enzyme ähnliche Strukturen und Molekulargewichte der Untereinheiten aufweisen [87]. Es ist möglich, daß sich in der heterologen Mischung eine noch höhere

Enzymaktivität ergibt, wenn die Testbedingungen optimiert werden. Zur endgültigen Klärung des Sachverhaltes sollten immunologische Kreuzreaktionen mit Antiseren gegen die getrennten E. coli-Untereinheiten abgewartet werden.

Nähere Untersuchungen der einzelnen Scenedesmus-Untereinheiten waren, abgesehen von Molekulargewichtsbestimmungen, wegen noch nicht ausreichender Reinheit (U2) und Menge (U1) wenig sinnvoll. Eine Zusammenstellung aller z. Zt. bekannten Molekulargewichte und S-Werte von RRasen und deren Untereinheiten zeigt Tab. 21.

Tab. 21: Molekulargewichte und S-Werte von RRasen und deren Untereinheiten

Organismus	Untereinheitenaufbau	Katalytisch aktives Enzym	Lit.
Typ I-RRasen			
E. coli	B1 160 000 (2x 80 000) $\alpha\alpha'$ 7,8 S B2 78 000 (2x 39000) β_2 5,5 S	245 000 10,1 S	104
T4-Phagen	170 000 (2x 85 000) α_2 70 000 (2x 35 000) β_2	225 000	133
Ehrlich-Ascites	5,7 S/6,5 S	9 S	88
Novikoff-Tumor	P1 180 000 (2x 90 000?) P2 ?	200-250 000	86
Kalbsthymus	80 000	11 S	83
Regen. Rattenleber	bisher nicht bekannt	6,6 S	138
Scenedesmus obliquus	U1 170 000 (2x 90 000), 8,5S U2 76 000 4,3S	?	
Typ II-RRasen (CoB_{12}-bedürftig)			
L. leichmannii	76 000	76 000 (5,2S)	135
E. gracilis	110 000	440 000	134
C. nephridii	100 000	210 000	*
Thermus X 1	80 000	80 000	8

* H. P. C. Hogenkamp: unveröffentlicht

Vollständige Kenntnisse über Typ I-RRasen liegen nur aus E. coli und T4-Phagen vor, während aus Kalbsthymus oder E. gracilis (Typ II) zwar reine, enzymatisch aktive, aber dennoch unvollständige Enzymspezies gereinigt wurden [82,83]. Die angegebenen S-Werte sind in Abwesenheit eines Effektornucleotids bestimmt, da besonders dATP bei dem Enzym aus E. coli, Ehrlich-Ascites, Kalbsthymus, Rattenleber und menschlichen Zellen zu Veränderungen des Sedimentationsverhaltens führt, die übereinstimmend als enzymatisch inaktive Aggregationen interpretiert werden.

Das Molekulargewicht von U2 - gelchromatographisch bestimmt - ähnelt mit 76 000 dem entsprechenden Teil von E. coli und T4-Phagen. Nach gelelektrophoretischer Trennung unter denaturierenden Bedingungen ist das Molekulargewicht von U1 (90 000) nur indirekt zugänglich: zur 4. Stunde des Zellzyklus fehlt die intensivste Proteinbande (Abb. 4l), U1 ist enzymatisch in dieser Fraktion nicht nachweisbar, und alle anderen in Frage kommenden Proteinbanden nach Hydroxylapatit-Trennung fehlen trotz Enzymaktivität. Voraussetzung dieser Schlußfolgerung ist der ideale Synchronisationsgrad der Scenedesmus-Zellen und der peakförmige, außerhalb der S-Phase auf Null zurückgehende Verlauf der RRase-Aktivität (Abb. 3); dagegen wäre ein vergleichbares Vorgehen mit tierischen Zellen nicht so eindeutig zu interpretieren. Das Sedimentations-Geschwindigkeitsexperiment ergibt näherungsweise ein Molekulargewicht von 170 000 mit der Folgerung, daß U1 aus zwei Peptidketten gleicher Größe (90 000) aufgebaut ist. Diese Untereinheitenstruktur scheint somit von E. coli, T4-Phagen bis zur eukaryotischen Alge beibehalten zu werden. Das chromatographische Verhalten bietet keine Anhaltspunkte für Dimerenbildung, zumal bei niedriger Proteinkonzentration, ohne Effektornucleotide und in Gegenwart von DTT gearbeitet wurde.

4.3.3 Einfluß von Metallionen

Typ I-Reduktasen sind i. a. für die Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen bekannt. Alle Versuche, eine Funktion von Magnesiumionen im Zusammenhang mit Scenedesmus-RRase nachzuweisen, blieben erfolglos. Mg^{2+} bleibt bei chromatographischen Trennungen ohne Einfluß auf den Zusammenhalt der Untereinheiten und es bewirkt im Enzymtest von 10 µM bis 10 mM nicht nur keine Stimulierung des Umsatzes, sondern inhibiert (Abb. 35) bei allen Konzentrationen, wobei sich der Hemmeffekt ab 1 mM nach Art einer Titrationskurve ausprägt. Dagegen tritt bei RRase aus E. coli, T4-Phagen und tierischen Zellen maximale Stimulierung durch 5-10 mM Magnesium auf.

Da mit gereinigten Fraktionen ohne Phosphatase-Aktivität und nur sehr geringer Kinasewirkung gearbeitet wurde, ist das fehlende Mg-Bedürfnis sicher der Algen-RRase zuzuschreiben und hängt nicht mit anderen Enzymreaktionen oder Komplexbildung mit Nucleotiden zusammen. Tierische RRasen werden zwar in Anwesenheit von Mg^{2+} getestet und Gelfiltrations- und Sedimentationsexperimente sprechen ebenfalls für deren Ähnlichkeit mit E. coli; genauere Vorstellungen der Wirkungsweise bestehen jedoch dort nicht [6,86,103,138]. Bei T4-Phagen wird das Enzym unabhängig von Magnesium aus den Untereinheiten gebildet, aber das Metall stimuliert den Umsatz. Man kann also wiederum unter den Typ I-Enzymen fließende Übergänge zwischen allen Möglichkeiten der Mg^{2+}-Wirkung konstatieren.

Bei der Ribonucleotidreduktion mit beiden RRase-Systemen sind radikalische Zwischenstufen beteiligt [1,8]. Während für Typ II-RRase Coenzym B_{12} zur Radikalbildung essentiell ist, weist die Untereinheit B2 aus E. coli und in T4-Phagen ein Tyrosylradikal auf, das durch "Nicht-Häm-Eisen" erzeugt und/oder stabilisiert wird [99]. Das Radikal ist Voraussetzung der enzymatischen Aktivität, die selbst von der Anwesenheit des Eisens abhängt. Da für Scenedesmus kein Hinweis auf CoB_{12}-Beteiligung besteht, wurde nach experimentellen Anhaltspunkten für Typ I-Verhalten nach dem Vorbild von E. coli gesucht.

Direkte Nachweise (ESR-Spektroskopie und Eisenbestimmung durch Neutronenaktivierungsanalyse) schieden wegen unzureichender Reinheit unserer Präparationen vorläufig aus. Das Absorptionsspektrum von B2 (E. coli) zeigt Banden bei 280 nm (ϵ = 11 200), 365 nm (6 000), 410 nm (4 100) und 480 (ϵ = 500) [8]. Der Eisengehalt steht im Zusammenhang mit den drei letztgenannten Peaks, die bei Entfernung des Metalls durch Komplexbildner verschwinden und bei Reaktivierung mit Eisenionen wieder auftreten. Falls eine Analogie besteht, erwartet man im Spektrum von U2 eine Absorption bei 420 nm, der nach 280 nm intensivsten Bande. Dieser Peak tritt jedoch nicht auf. Dagegen findet man unerwarteterweise nach der affinitätschromatographischen Trennung und unabhängig vom Affinitätsmaterial in U1 ein Absorptionsmaximum bei 415 nm (Abb. 37), das allerdings nach dem folgenden Reinigungsschritt an DEAE-Cellulose nicht mehr nachweisbar ist. Für die Zugehörigkeit dieser Bande zu einer Verunreinigung spricht, daß Hydroxylaminbehandlung und Reaktivierung mit Eisen ohne Einfluß auf diesen Spektralbereich bleiben. Wenn der Peak aber trotzdem RRase sein sollte und man gleiche Extinktionsverhältnisse wie bei E. coli zugrundelegt, muß der Nachweis vorläufig offen bleiben, denn in der am weitesten gereinigten Fraktion mit E_{280} = 0,05 erwartet man bei 415 nm nur E_{415} = 0,0025, was nicht mehr sichtbar ist.

Indirekte Hinweise auf Fe^{2+} sind durch Hemmversuche mit Komplexbildnern und eine eventuelle Stimulierung der Enzymaktivität durch Eisenionen zu erhoffen. Eisenzugabe zu Mischungen der gereinigten Scenedesmus-Untereinheiten ergeben aber eine Hemmung bei 10-1000 µM Fe^{3+} (Abb. 36). Da auch in E. coli ein positives Ergebnis nur unter bestimmten Bedingungen zu beobachten ist [99], schließt das Experiment allerdings eine Eisenbeteiligung keineswegs aus. Auch die Enzyme aus Säugerzellen zeigen keine einheitlichen Resultate [86,100,147]: Man findet Stimulierung, indifferentes Verhalten und - wie hier - Hemmung des Enzyms. Diese Eigenschaft wird mit dem je nach Aufarbeitung unterschiedlichen Eisengehalt interpretiert, wobei das Metallbedürfnis zusätzlich von pH-Wert, DTT-Konzentration, der Anwesenheit von Thioredoxin und der Art des Puffers in nicht durchschaubarer Weise abhängt. Auch in

tierischen Zellen fehlt ein definitiver Nachweis des Metalls. Hemmung mit N-Hydroxyharnstoff (HU) und die Reaktivierung mit Eisenionen geben einen positiven Hinweis auf Eisenbedürfnis der Scenedesmus-RRase (Tab. 14). Der intrazelluläre Wirkungsmechanismus von N-Hydroxyharnstoff ist strittig; über die Hemmwirkung von HU speziell auf Typ I-RRasen herrscht dagegen kaum Zweifel. Er wird als DNA-Synthese-Inhibitor, Cytostatikum, Mutagen und zur Zellsynchronisation eingesetzt, da er in vivo reversibel wirkt und mit wenigen Ausnahmen die Protein- und RNA-Synthese unbeeinflußt läßt [140-142]. Weitere Wirkungen auf die Struktur replizierender DNA und dNTP-Pools sind beschrieben [17,136]. Er zerstört ohne Veränderung des Eisengehaltes in E. coli-RRase das Tyrosylradikal, ähnlich wie er in einem chemischen Polymerisationssystem als Radikalfänger wirkt [99]. Andererseits bildet er als Hydroxamsäure Komplexe mit Eisenionen. Eisen reaktiviert in noch nicht verstandener Weise hydroxyharnstoffbehandelte RRase aus E. coli und (teilweise) aus Novikoff-Tumor, so daß in dieser Hinsicht Übereinstimmung mit dem Algenenzym besteht [99,142]. Die Konzentrationsabhängigkeit der RRase-Hemmung mit HU weist Speziesunterschiede, aber auch substratabhängige Unterschiede auf [101]: Beispielsweise führt 1 mM HU im CDP-Reduktasetest bei Scenedesmus zu 31 %, bei CHO-Zellen zu 90 %, Novikoff-Tumor zu 85 %, Hefe (2,5 mM) zu 30 % und E. coli zu 25 % Hemmung gegenüber der Kontrollaktivität [36,119,143,144].

Die Gründe dieser Unterschiede können in vitro in der Festigkeit der Eisenbindung liegen. In vivo spielen noch Differenzen der Permeabilität und des Turnovers von HU mit. N-Hydroxyharnstoff inhibiert (5 mM dem Kulturmedium zugesetzt) auch Ribonucleotidreduktase-Aktivität in vivo zu 90 % und führt wie in Chlorella erwartungsgemäß zum Stillstand der Zellproliferation. Bei Organismen mit Coenzym B_{12}-abhängiger RRase fehlt dieser Effekt in vivo und ebenso im in vitro-Test [1,8].

4.3.4 Thioredoxinabhängigkeit

Unabhängig von der enzymatischen Klassifizierung akzeptieren alle bisher untersuchten RRasen ihr homologes Thioredoxin als Cosubstrat. Mit wenigen Ausnahmen reagieren auch heterologe Proteine, freilich mit höherem K_m-Wert. Scenedesmus-RRase bildet keine Ausnahme und setzt neben der Mischung der homologen, cytoplasmatischen Thioredoxine B1 und B2 Thioredoxine aus Hefe, E. coli, Synechococcus um, so daß offenbar auch im Pflanzenreich Thioredoxine als reduzierende Cosubstrate der Ribonucleotidreduktion wirken. Ungewöhnlich sind allerdings die quantitativen Unterschiede: Während die Aktivität mit der homologen Thioredoxin Mischung bei Sättigung nur auf das Doppelte steigt, findet man mit Thioredoxin aus Hefe und E. coli eine 7-fache Stimulierung. Dies ist vorläufig auch deshalb unverständlich, weil Hefe- und Scenedesmus-Thioredoxin B2 laut Aminosäurezusammensetzung und Molekulargewicht nahezu identisch sind. Ferner unterscheiden sich die K_m-Werte von Hefe und dem bakteriellen Thioredoxin ($0{,}1 \times 10^{-6}$ und $1{,}4 \times 10^{-5}$) um den Faktor 140. Dagegen fand Wagner bei E. coli-RRasen nur Differenzen von einer Zehnerpotenz [18]. Für die homologe Mischung B1 und B2 kann zwar kein genauer Zahlenwert für K_m angegeben werden, doch läßt sich aus Abb. 38 die gleiche Größenordnung wie für Hefe-Thioredoxin abschätzen. Denkbar ist auch, daß das DTT/Thioredoxin-Verhältnis für Tests der Scenedesmus-RRase wesentlich anders ist als bei E. coli-RRase (deren Testbedingungen hier übernommen wurden), so daß das homologe Thioredoxin nicht unter optimalen Bedingungen stimulieren konnte.

Leider war das chloroplastidäre Thioredoxin A zum Vergleich nicht verfügbar [18], das zwar mit E. coli-RRase geringere Umsätze als BI-BII erbringt, aber nähere Aufschlüsse über die Kompartimentierung geben könnte. Da die Existenz von Glutaredoxin (in E. coli bekannt) für Scenedesmus ausgeschlossen werden kann [18], bleibt offen, ob eines oder mehrere der Thioredoxine als physiologisches Cosubstrat anzusehen ist. Die Frage nach der Herkunft der Reduktionsäquivalente ist ebenfalls noch nicht endgültig beantwortet, da eine NADPH-abhängige Thioredoxinreduktase nicht nachweisbar ist und lediglich Hinweise auf die Mitwirkung einer Ferredoxin-abhängigen Thioredoxinreduktase bestehen [18].

4.3.5 Allosterisches Verhalten

Die Aktivität aller Ribonucleotidreduktasen wird durch allosterisch wirksame Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP) und ATP art- und substratspezifisch unterschiedlich beeinflußt, wobei K_m und Geschwindigkeitskonstanten verändert werden. Intensiver studiert wurden Typ I-RRasen aus E. coli, T4-Phagen und Säugerzellen [1,8]. Nach eigenen Erfahrungen können Erkenntnisse unter Verwendung wenig gereinigter Enzympräparationen im Zuge der Reinigung korrekturbedürftig werden. Dieser Vorbehalt betrifft besonders kinetische Befunde mit Enzymen aus tierischen Zellen.

Ein essentielles Nucleotidbedürfnis der Scenedesmus-RRase besteht nicht. Die Verwendung von dATP (10 µM) als positivem Effektor im Test ist jedoch vorteilhaft, weil im Gegensatz zu ATP nicht nur störende CDP-Kinasereaktionen zurückgedrängt, sondern auch bei weitergehender Reinigung höhere Umsätze erreicht werden. Der Einsatz gereinigter RRase schließt aus, daß Änderungen der Enzymaktivität, wie im Rohhomogenat vermutet, durch andere störende, enzymatische Reaktionen bedingt sind. Sie sind deshalb als allosterische Beeinflussung der Enzymaktivität zu werten. Ebenso eluiert dATP die Untereinheit U1 selektiver von 2',5'-ADP-Sepharose als ATP. Die ist auch deshalb zu erwarten, da außer RRase meines Wissens nur noch DNA-Ligasen von dATP allosterisch beeinflußt werden, die ebenfalls mit Hilfe von ionisch an Austauscherharze gebundenem dATP zu reinigen sind [145,146].

Das Desoxyribonucleotid zeigt wie in E. coli und CHO-Zellen ein ambivalentes Verhalten [70,147]: Zunächst bis ca. 10 µM stimulierend, bei höherer Konzentration aktivitätshemmend. Vergleichsweise führt in E. coli bereits mehr als 1 µM dATP zur Hemmung und Aggregation des B1/B2-Komplexes [154]. In anderen tierischen Zellen gilt dATP als Inhibitor, ohne daß die Stimulierung bei niedrigen Konzentrationen festgestellt wurde; dagegen wirkt es bei T4-Phagen generell aktivitätssteigernd [87]. Während eine ausgeprägte Spezifität für Cytidindiphosphat als Substrat besteht, scheint sie für das allosterisch wirksame dATP weniger ausgeprägt, da auch dADP deutlich stimulierend auf die

CDP-Reduktion wirkt. Vermutlich sind mit anderen (Desoxy) Nucleotiden bei optimaler Konzentration höhere Umsätze zu erzielen wie bereits ein Vergleich bei einer Konzentration (10 µM) andeutet, der mit dTTP eine 25 %ige Aktivitätssteigerung gegenüber dATP einbringt. Zur weitergehenden Bestimmung aller substratspezifischen Effektorwirkungen auf die Enzymaktivität und dem Vergleich dieses Musters mit anderen RRasen bleibt die Reinigung bis zur Homogenität abzuwarten.

Die allosterische Bindung der Nucleotide erlaubt die Anwendung affinitätschromatographischer Reinigungstechniken mit immobilisierten Nucleotiden. Dies läßt Rückschlüsse auf Enzymeigenschaften zu: Da stets nur eine Untereinheit (U1) an alle wirksamen Affinitätsgele bindet, scheinen die allosterischen Nucleotidbindungsstellen wie auch im Falle von E. coli und T4 dort lokalisiert [132]. U1 wird bereits mit 100 µM dATP von 2',5'-ADP-Sepharose eluiert, so daß umgekehrt 2',5'-ADP (und alle anderen wirksamen Materialien) an allosterischen dATP-Bindungsstellen des Enzyms bindet. Da zusätzlich auch ATP wirksam ist, sollte es ebenfalls um diese dATP-"Sites" konkurrieren und dort binden. Diese Anschauungen stützen sich auf analoge Erfahrungen mit E. coli-RRase und Dehydrogenasen, die zeigen, daß - sogar quantitativ - Ergebnisse aus affinitätschromatographischen Elutionsexperimenten mit Bindungsstudien konsistent sind [132,148]. Eine Voraussetzung scheint neben der biospezifischen Bindung des Enzyms in der Verwendung von geringen Nucleotidkonzentrationen zu liegen, um unspezifische Effekte zu vermeiden.

4.4 Assoziation von RRasen mit anderen Enzymen der Nucleinsäuresynthese

Bisher fehlen direkte Beweise, daß RRase als cytoplasmatisches, lösliches Enzym in vivo mit anderen Proteinkomponenten organisiert ist, doch mehren sich experimentelle Befunde und Spekulationen, die diese Möglichkeit nahelegen. Elford fand eine Assoziation von RRase mit drei weiteren Enzymen der DNA- und DNA-Vorläufersynthese auf Membranfragmenten tierischer Zellen,

(DNA-Polymerase II, RRase, Thymidylat-Synthetase, Thymidin-Kinase) wobei die Enzymaktivitäten und Proliferationsrate positiv korrelieren. Für T4-Phagen existiert eine Reihe genetischer und biochemischer Hinweise. U. a. wurde gezeigt, daß Enzyme der DNA-Replikation und dNTP-Synthese zwar zu verschiedenen Zeitpunkten der Phageninfektion synthetisiert werden, aber ihre Funktion in vivo erst später gemeinsam aufnehmen, so daß die Bildung eines Multienzymkomplexes naheliegt [107]. Wie für E. coli nachgewiesen wurde, liegt RRase in vivo in einer besonders aktiven, sehr labilen Organisationsform vor, die sich der Reinigung in intakter Form entzieht [69]. Außerdem ist CDP-Kinase-Aktivität aus E. coli sowohl mit beiden hochgereinigten RRase-Untereinheiten als auch DNA-Polymerase assoziiert [78,149]. In die gleiche Richtung weisen genetische Befunde und in vitro-Experimente mit einem DNA-Synthesesystem [150]. Ferner sind eukaryotische Polymerasen mit assoziierten Exonuclease-Aktivitäten beschrieben [151]. Hier war ein Desoxyribonucleotid-umsetzendes Enzym mit mehreren katalytischen Funktionen noch nie nachweisbar. Die äußerst geringe stationäre dNTP-Konzentration wäre auch als Konsequenz eines Multienzymkomplexes interpretierbar, in dem Desoxyribonucleosidtriphosphate von den Enzymen der DNA-Vorläufersynthese auf die des Replikationskomplexes - ohne freie Diffusion - übertreten würde [152].

In Übereinstimmung mit E. coli kann auch in den am weitesten gereinigten Fraktionen der Scenedesmus-RRase Untereinheit U1 stets geringe, nicht abtrennbare CDP-Kinase-Aktivität nachgewiesen werden. In Fraktion U2 tritt zusätzlich eine nicht näher charakterisierte "Polymerase"-Aktivität auf, die als Matrize native und "nicked" DNA sowie Poly [d(A-T)] akzeptiert und wie eukaryotische DNA-Polymerasen, z. B. Pol B aus Chlamydomonas, durch Kaliumionen stimuliert wird [105,151]. Auch das Molekulargewicht von 70-80 000, das aus der Co-Chromatographie mit U2 an Sephadex G-100 folgt, stimmt mit Literaturwerten für "große" DNA-Polymerasen (6-8S) überein[105]. Auffällig ist, daß beide Enzyme - Diphosphatkinase und DNA-Polymerase-funktionell mit RRase in vivo verbunden sind.

Es kann zwar nicht völlig ausgeschlossen werden, daß diese Enzyme ohne eine physiologisch relevante Assoziation aufgrund ähnlicher Eigenschaften und Art der Reinigungsschritte, besonders PEI-Fällung und Affinitätschromatographie, gemeinsam gereinigt wurden; angesichts der für U2 ca. 400-fachen und für U1 nahezu 6000-fachen Protein-Anreicherung erscheint dies aber wenig wahrscheinlich. Da gegenwärtig selbst für die homogene E. coli-RRase noch keine proteinchemischen Untersuchungen existieren, die allein die Frage Enzym-Assoziate/multifunktionelle Enzyme klären könnten, kann man nur aus der wachsenden Zahl ähnlicher Beobachtungen folgern, daß RRasen tatsächlich als Teil eines "Enzym-Clusters" in vivo vorliegen [152].

4.5 Intrazelluläre Desoxyribonucleotid-Pools

Ribonucleotidreduktion ist eine notwendige Voraussetzung zum Auftreten signifikanter Mengen freier Desoxyribonucleotide, deren Ausmaß und Verhältnis sich als Folge ihrer eigenen allosterischen Rückwirkung auf RRase einstellt [123]. Umgekehrt beweist ein fehlender dNTP-Pool nicht, daß die Zelle keine RRase enthält, so daß erst die gemeinsame Messung der Nucleotidgehalte (in vivo) und Enzymaktivität (in vitro) genauere Rückschlüsse auf die DNA-Vorläuferproduktion zuläßt. Dabei scheint es geboten, dNTP anstelle der unmittelbaren Reduktionsprodukte dNDP zu bestimmen, weil keine Hinweise dafür bestehen, daß die Phosphorylierung zum Triphosphat eine geschwindigkeitslimitierende Reaktion der DNA-Bausteinsynthese ist; ferner gelten Triphosphate als dominierende Form der Desoxyribonucleotide und korrelieren in synchronisierten Zellen mit der DNA-Syntheserate [17,123,155]. Jede Messung erfaßt einen dNTP-Pool im "steady state", dessen Turnover aus der allosterisch regulierten Neubildung und dem Verbrauch durch enzymatischen Abbau und DNA-Synthese resultiert. Die direkte, enzymatische dNTP-Bestimmung ohne Eingriff in die endogenen Pools ist grundsätzlich der radioaktiven Markierung mit Nucleosiden und ^{32}Phosphat überlegen. Häufig auftretende Fehlerquellen, so u. a. enzymatischer Nucleotidabbau oder niedermolekulare Polymerase-Inhibitoren [58] blieben bei Extrakten aus Scenedesmus-Zellen ohne erkennbaren Einfluß, weil zum Homogenat zuge-

setztes Desoxyribonucleotid quantitativ wiedergefunden wurde.

Die von Reichard und Skoog geäußerten Verallgemeinerungen für dNTP-Pools tierischer Zellen gelten hier nur teilweise [17,123] (Abb. 45): Maximale Pools treten stets während der S-Phase auf. Sehr geringe, aber meßbare Gehalte weisen aber auch die Zellen auf, die sich nicht in der S-Phase befinden. Im Gegensatz zu den nur unvollständig synchronisierten tierischen Zellen ist dies in Scenedesmus und Chlamydomonas keine Folge unzureichender Synchronisation. Eine Ausnahme macht dGTP von dem bereits zur O. Stunde (G1-Phase) mehr als 5 pMol/10^6 Zellen gefunden werden.

Obwohl zur Replikation der gleiche Bedarf aller vier Nucleotide besteht, weisen Säugerzellen bis zu 100-fache Unterschiede der Poolgrößen auf: dGTP hat immer den kleinsten Pool mit größtem Turnover, dCTP gilt gewöhnlich als größter Pool, in Mikroorganismen wie Physarum, Euglena, Tetrahymena ist es dTTP [111,156,157]. Dagegen kehrt sich die Reihenfolge für Scenedesmus um. Man findet dGTP > dTTP > dATP > dCTP bei höchstens 5-facher Differenz. Dieser Gang stimmt - abgesehen von dGTP - mit den Werten für Chlamydomonas-Zellen überein [112].

Im Gegensatz zu allen Erfahrungen mit anderen Organismen erreicht der dGTP-Gehalt unerwarteterweise auch außerhalb der S-Phase mit und ohne 5-FdUrd (s. u.) hohe Werte. Trotz des großen Blindwertes bei enzymatischer Bestimmung an einer Poly[d(G-C)]-Matrize resultiert ein linearer Einbau mit vorgegebenem dGTP, so daß systematische Meßfehler sehr unwahrscheinlich sind. Als Konsequenz wäre eine in dieser Form bisher unbeobachtete, gesonderte GDP-Reduktase zu fordern, die von der S-Phase abgekoppelt und unabhängig von CDP-, ADP- und UDP-spezifischer Reduktase während des gesamten Zellzyklus vorliegt. Diese Möglichkeit mehrerer RRasen wurde schon von anderen vermutet, jedoch bisher nicht bewiesen [86,117]. Sie ließe sich für Scenedesmus direkt bestätigen wenn aus Zellen der G1- und G2-Phase GDP-Reduktase in vitro nachzuweisen wäre. Die Bestimmung von Desoxyguanosinderivaten ist jedoch methodisch schwierig und wurde zurückgestellt.

Wie auch bei Chlamydomonas kann trotz des hohen Synchronisationsgrades der Zellen keine klare Aussage getroffen werden, ob die Desoxyribonucleotidbildung der DNA-Synthese vorausgeht oder umgekehrt der Replikationsbeginn erst die Vorläufersynthese initiiert [112]. Ebenso bleibt offen, ob die sehr niedrigen dNTP-Gehalte außerhalb der S-Phase, wo in vitro keine RRase-Aktivität meßbar ist, einfache Restgehalte sind oder auf anderem Wege (z. B. der Transglycosidierung) zustandekommen. Die Zellen besitzen sicher einen Nucleotidbedarf für Organellen- und Reparatur-DNA-Synthese, deren zeitliche Verteilung im Zellzyklus von Scenedesmus (oder Chlorella) jedoch unbekannt ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden die Ribonucleotide ADP und CDP (aus Analogiegründen vermutlich auch UDP) von derselben RRase umgesetzt, so daß die peakförmigen Veränderungen der dNTP-Pools während der S-Phase durch den variablen RRase-Gehalt (Abb. 3) bedingt sind. Erst die allosterische Feinregulation mit dem für Scenedesmus noch unbekannten Muster bewirkt die relativen Unterschiede. Da die Reihenfolge der Poolgrößen von der in tierischen Zellen gefundenen abweicht, ist zu erwarten, daß auch die Regulationsmuster unterschiedlich sind. Die in Scenedesmus ungewöhnlich gute zeitliche Übereinstimmung von DNA-Synthese, RRase-Aktivität und dNTP-Gehalt als Folge der vollständigen Synchronisation zeigt, daß zwischen Replikation und Vorläufersynthese, die auf die Bildung von RRase zurückgeht, eine enge Kopplung bestehen muß [116].

Um eine Größenordnung der intrazellulären dNTP-Konzentrationen abzuschätzen, ersetzt man näherungsweise das Zellvolumen durch pcv und nimmt vereinfachend eine gleichmäßige Verteilung innerhalb des Zellvolumens an [158]. Für die 12. Stunde des Zellzyklus ergaben sich folgende unteren Grenzwerte: dGTP: 21 µM; dTTP: 9 µM; dATP: 6 µM; und dCTP: 5 µM. Danach stimmt die zelluläre dATP-Konzentration gut mit der optimalen Effektorkonzentration (10 µM) im CDP-Reduktasetest und größenordnungsmäßig auch mit den Gehalten anderer Zellen, z. B. des Seeigels oder Yoshida-Ascites-Tumorzellen überein [124,125].

Weitergehende Erkenntnisse bietet das Experiment in Gegenwart von 5-FdUrd. Der Stillstand der gerade beginnenden DNA-Synthese (9. h) ist durch das Absinken des dTTP-Pools auf Null bedingt, der damit zum die DNA-Synthese limitierenden Faktor wird (Abb. 46). Die Ursache liegt - wie aus vielen anderen Organismen bekannt ist - in der spezifischen Hemmung der Thymidylatsynthetase (EC 2.1.1.45) durch 5-FdUMP [176]. Mithin gleicht auch das Enzym der Alge seinen bakteriellen und tierischen Pendants, obwohl Thymidylatsynthetase aus Pflanzen bisher noch nicht isoliert und studiert werden konnte.

Wie bereits gezeigt (Abb. 8), steigt die CDP-Reduktase-Aktivität in Folge der Hemmung weiter an, so daß der stark erhöhte dATP-Gehalt der Zellen leicht verständlich ist: Die relative Größe aller Pools ist aber auch hier wie in unbehandelten Zellen weiterhin durch allosterische Einflüsse bei gleichzeitig fehlendem Nucleotidverbrauch durch DNA-Synthese reguliert. Der Pool-Anstieg und Abfall von dTTP und dCTP während der S-Phase (Abb. 45) bleibt aus, denn das akkumulierte dATP inhibiert (in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der in vitro-Enzymtests) die dCTP-Bildung. Ebenso entfällt die zusätzliche Erhöhung von dGTP, dessen Synthese durch dATP offenbar ebenfalls gehemmt wird.

Näherungsweise (s. o.) beträgt die zelluläre dATP-Konzentration 32 µM zur 24. Stunde, eine Konzentration, die auch im Assay bereits deutlich inhibiert. Bei Hemmung der Thymidylatsynthese bleibt zwar eine Zellteilung aus, dagegen hält das Zellwachstum ständig an. Den in Abb. 46 dargestellten Nucleotidgehalten entsprechen deshalb nur geringere intrazelluläre Konzentrationserhöhungen.

Trotz fortdauernder 5-FdUrd-Einwirkung tritt eine geringe, kontinuierliche Steigerung des dTTP- und dCTP-Gehaltes auf und führt zum langsamen Fortschritt der DNA-Bildung. Die Ursache hierfür kann nur vermutet werden: Als Folge der Blockade der Thymidylatsynthetase steigt auch der dUMP-Gehalt an, da intermediär gebildetes dUTP (via RRase) rasch zu dUMP (dUTPase) abgebaut wird, das wiederum mit 5-FdUMP kompetitiv um die Substratbindungsstelle (neugebildeter?)

Thymidylatsynthetase konkurriert, deren Aktivität deshalb mit zunehmendem dUMP-Gehalt ansteigt [160,161,176]. Hilfreich könnte auch die Beeinflussung der dCMP- oder dCTP-Desaminase durch dTTP sein, das diese Enzyme allosterisch inhibiert, während dCTP aktiviert [61,161,164]. Diese Hypothese deckt sich mit kinetischen Befunden und Markierungsexperimenten, die z. B. in S. typhimurium [61,159], E. coli oder in menschlichen Lymphozytenkulturen zum Teil drastische Steigerungen des dUMP-Pools-bis zu 97 % der Gesamtradioaktivität aus [^{3}H]dCyd erscheinen in dUMP - bei Hemmung der Thymidylatsynthese zeigen [160-162]. Eine umfassende Interpretation dieser Effekte erforderte aber nicht nur die Kenntnis der allosterischen Einflüsse an RRase und die stationären 5-FdUMP/dUMP-Konzentrationen, sondern sollte neben kinetischen Daten und der Volumenzunahme der Zelle auch die Raten der Neusynthese und des Abbaus von RRase und anderen nucleotidumsetzenden Enzymen, besonders Thymidylatsynthetase berücksichtigen. Sowohl in Thymin-Mangelmutanten von E. coli als auch nach 5-FdUrd-Hemmung steigen dATP- und dCTP-Pools mit dem RRase-Gehalt an, während - wie in Scenedesmus - dGTP unbeeinflußt bleibt. In der Bewertung dieser Experimente legen Neuhard und Thomasson mehr Gewicht auf allosterische Einflüsse als auf die RRase-Neusynthese [159].

Ähnliche Auswirkungen der Thymidylatsynthesehemmung mit 5-FUra und Methotrexat auf dNTP-Pools sind auch für tierische Zellen publiziert, obwohl Änderungen des RRase-Gehaltes nicht untersucht wurden [146,161-163]. Die Poolschwankungen konnten jedoch dort nicht alleine als allosterische Auswirkungen an RRase in Folge des verminderten dTTP-Pools interpretiert werden.

4.6 Der Einfluß von 5-Fluordesoxyuridin und anderen Substanzen im Zellzyklus

Ribonucleotidreduktase-Aktivität wird durch Einwirkung von 5-Fluordesoxyuridin und 5-Fluoruracil auf Scenedesmus-Zellen gesteigert. Dieser Effekt bot, zunächst als Hilfsmittel eingesetzt, eine günstige Ausgangssituation zur Enzymreinigung. Er wurde auch in E. coli, L. leichmannii, Hefe und Säugerzellen beobachtet und scheint eine vom RRase-Typ unabhängige,

allgemeingültige Konsequenz der Regulation des Enzyms im Zellstoffwechsel [14,71,72,159], zu sein. Unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe des Hemmstoffs vor der S-Phase (1-9. Stunde) steigt die Enzymaktivität wie in unbehandelten Algen zum normalen Zeitpunkt der DNA-Replikation kontinuierlich an [14]. Dies zeigt, daß die Fluornucleoside nicht den Beginn, sondern offenbar das "Abschalten" der Enzymneubildung nach der S-Phase beeinflussen. Der Aktivitätsanstieg ist Cycloheximid-sensitiv, wird dagegen nur wenig (10 %) von Lincomycin, einem Hemmstoff der chloroplastidären Proteinbiosynthese, inhibiert, so daß die kontinuierliche Neusynthese beider Untereinheiten an cytoplasmatischen Ribosomen zu vermuten ist [14,71,122,165]. Wie ein Kombinationsexperiment mit den getrennten, aktiven Untereinheiten belegt (Tab. 16), besteht in Zellen der 4. Stunde kein ausreichender Gehalt einer Untereinheit, um dem RRase-Aktivitätsanstieg zur S-Phase (durch Bildung der komplementären Untereinheit) zu genügen. Die RRase-Aktivität im Zellzyklus kann deshalb auf die simultane Synthese beider Untereinheiten zurückgeführt werden [165].

Alternative Interpretationen, etwa die verstärkte Synthese einer die Enzymaktivität stimulierenden Substanz oder die Verminderung eines inhibierenden Faktors sind unwahrscheinlich, weil auch die Enzymaktivität teilgereinigter PEI-$(NH_4)_2SO_4$-Fraktionen weit größer als die aus unbehandelten Zellen ist. Wir gehen zunächst davon aus, daß "stimuliertes" und normalerweise auftretendes RRase-Protein miteinander identisch ist, wie dies auch in E. coli gezeigt werden konnte [98]. Die Prüfung dieses Sachverhaltes anhand kinetischer und molekularer Eigenschaften steht noch aus.

Interessant ist auch der zur weiteren Aktivitätserhöhung essentielle Einfluß von Licht; Verdunkelung der Kultur in der 14. h führt zum gleichen Aktivitätsverlust wie Cycloheximid. Die Ursache ist unklar, doch sollte sich mit Hilfe mixotropher Algenkulturen prüfen lassen, ob Licht lediglich zur Aufrechterhaltung eines hohen ATP-Spiegels (und hoher Proteinsynthesekapazität) notwendig ist. Für diese Hypothese spricht, daß die Alge in Folge des ebenfalls stimulierten Zellwachstums stark

von Energie- d. h. Lichtzufuhr abhängig ist. In diesem Zusammenhang deutet die rasche Aktivitätsverminderung bei Hemmung der Neusynthese auf die kurze Lebensdauer des Enzyms in vivo, d. h. auf raschen Turnover, hin [5,14,71].

Die Wirksamkeit von 5-FdUrd und 5-FUra legt nahe, die Ursache der RRase-Aktivitätssteigerung in der Hemmung der Thymidylatbildung bzw. Thymidylatsynthetase zu vermuten, zumal Thymidin antagonistisch wirkt. Einen unabhängigen Hinweis darauf liefert Methotrexat, ein Inhibitor der NADPH-abhängigen Dihydrofolatreduktase, der über ein Absinken des zellulären Cl-Pools indirekt auch die Thymidylatsynthese beeinflußt. Methotrexat zeigt den gleichen, wenn auch weniger ausgeprägten Effekt wie 5-FdUrd und führt ebenfalls bei kontinuierlichem Wachstum zur Ausbildung großer, teilungsgehemmter Zellen. Die geringere Wirksamkeit ist verständlich, weil gleichzeitig wahrscheinlich Purin- und Glycinsynthese so gestört werden, daß auch Adenosin und Glycin im Kulturmedium keine weitere RRase-Steigerung einbringt (S. 123) [146]. Auch wurde die Methotrexat-Konzentration nicht optimiert. Die Enzymaktivität nimmt in 5-FdUrd-Gegenwart stärker als mit 5-FUra ab: Während das wirksame Agens 5-FdUMP durch Phosphorylierung von 5-FdUrd rasch eine hohe stationäre Konzentration erreichen sollte, muß 5-FUra zusätzlich den "salvage pathway" durchlaufen und sollte deshalb in geringerer 5-FdUMP-Konzentration vorliegen. Unerwarteterweise ist auch Desoxyuridin hemmend wirksam: Wie oben erwähnt, steigt der dUMP-Pool in allen untersuchten Zellen als Folge der Thymidylatsynthetasehemmung an. Exogenes dUrd erzeugt offenbar dieselbe Situation.

Fraglich ist, ob ursächlich nicht das Absinken des dTTP-Pools, sondern erst die Expansion der dUMP-Konzentration die RRase- und Wachstumsteigerung initiiert. Eine plausible Deutung des ebenfalls wirksamen 5-BrdUrd steht aus. Es hemmt zwar bakterielle Thymidinkinase kompetitiv ($K_i = 2{,}4 \cdot 10^6$ M), doch wird es in hoher Ausbeute anstelle von Thymidin in DNA eingebaut und ruft erst dort eine Vielzahl von Veränderungen der Genexpression hervor [166,167]. Andere, nicht am Thymidylatstoffwechsel eingreifende Inhibitoren (ara-C, N-Hydroxyharnstoff, Nalidixinsäure) zeigten keinen Einfluß, so daß eine unspezifische Hemmung der

DNA-Synthese als Ursache der Aktivitätssteigerung ausscheidet.

Diese Ergebnisse legen in Übereinstimmung mit Elford [71] nahe, dTTP oder einem damit in Zusammenhang stehenden Metaboliten eine mit "Repressor" oder "Corepressor" vergleichbare Funktion in einem hypothetischen Regulationssystem zuzuschreiben, zumal ähnliche Befunde auch aus anderen pro- und eukaryotischen Organismen wie E. coli, L. leichmannii, HeLa-Zellen und Hefe bestehen [14,71,72,159]. dTTP käme deshalb mehrfache Bedeutung zu: Neben seiner Rolle als DNA-Baustein (mit gesonderter Biosynthese) wirkt es konzentrationsabhängig als allosterisch wirksames Nucleotid und als Teil eines Regulationssystems. Dagegen zeigen Filpula und Fuchs in E. coli, daß nicht alleine Thyminmangelbedingungen, sondern auch durch die Hemmung der DNA-Synthese mit Inhibitoren wie Nalidixinsäure oder in temperatur-sensitiven Mutanten erhöhte RRase-Gehalte induziert werden und selbst das Ausmaß der Hemmung mit dem resultierenden Enzymspiegel korreliert [127,128]. Auch in Säugerzellen wurden RRase-Aktivitätssteigerungen bei DNA-Synthese-Hemmung mit N-Hydroxyharnstoff beobachtet [126], doch ist dieser Inhibitor nicht sehr spezifisch. Die mangelnde Wirkung von araC, einem universellen DNA-Polymerase-Inhibitor, auf die RRase-Aktivität in Scenedesmus spricht gegen eine Signalwirkung der DNA-Synthese selbst [108]. Keineswegs stimuliert die Thymidylat-synthesehemmung alleine die RRase-Bildung, sondern ähnliche Aktivitätssteigerungen wie für RRase sind auch von Thymidylat-synthetase, Thymidinkinase und Dihydrofolatreduktase in T4-Phagen, HeLa-Zellen, Novikoff-Hepatom und regenerierender Rattenleber bekannt [71,169,107]. Obwohl artspezifische Unterschiede bestehen, wurde vermutet, daß die Expression einiger beteiligter Gene zusammen nach Art eines Operons organisiert ist. Dagegen ändern sich Thioredoxin- und Thioredoxinreduktase-Gehalt weder in E. coli noch in der Leber parallel zur RRase-Aktivität [165,170].

Das unverminderte Wachstum der Scenedesmus-Zellen steht mit einem bisher ungeklärten Phänomen, dem "thymineless death" in Zusammenhang, der bei Thymidinmangel z. B. in E. coli (durch Hemmstoffe oder Thy^--Mutanten) auftritt [171]: Es kommt zu stark vermehrter Proteinbiosynthese und RNA-Bildung bei konstantem DNA-Gehalt und führt letztlich

zur irreversiblen DNA-Schädigung (Hemmung der Polynucleotid-Ligase durch erhöhten dATP-Spiegel?) [163] und zum Zelltod. Dieses "Entkoppeln" oder "unbalanced growth" von Protein- und DNA-Synthese bei fortschreitendem Zellwachstum und fehlender Zellteilung ist auch unter anderen Bedingungen möglich: Euglena gracilis oder Rhizobium meliloti werden bei Vitamin B_{12}-Mangelbedingungen in der S-Phase des Zellzyklus angehalten, ihr Protein-, RNA- und Chlorophyll-Gehalt steigt an, sie bilden große Zellen aus, sind jedoch nicht in der Lage DNA zu synthetisieren [111]. Angriffspunkt ist dort Ribonucleotidreduktase (Typ II). Ohne Vitamin B_{12} kann keine enzymatisch aktive RRase gebildet werden. Unter diesen Bedingungen können keine dNTP-Pools nachgewiesen werden und inaktives RRase-Apoprotein wird vermehrt synthetisiert [111,173]. Die Ausbildung großer Zellen ist auch bei krankhaftem (megaloblastische Anämie) oder künstlich hervorgerufenem Folat- und damit auch Thymidylatmangel (Krebs-Chemotherapie) bekannt [163,175].

Nach einem Modell von Mitchison ist der Zellzyklus aus zwei lose gekoppelten Zyklen, dem "growth cycle" und dem "DNA-division cycle" aufgebaut [174]. Zwischen ihnen existieren koordinierende Mechanismen, die im "balanced growth" für das ausgewogene Fortschreiten beider Zyklen sorgen. Bei den oben erwähnten Phänomenen ist ihr Zusammenspiel gestört. DNA-Replikation und Vorläufersynthese gehörten nach diesem Bild verschiedenen Zyklen an. Wie Goetz und Carell vermuten, könnte der Größe der dNTP-Pools diese Verbindungsfunktion zukommen [111]. Verallgemeinernd ergibt sich folgende Hypothese: Allein durch die Wahl der Wachstumsbedingungen, die zum "unbalanced growth" und zur Ausbildung der auch in Scenedesmus beobachteten großen Zellen bei gleichzeitiger Teilungshemmung führen, sollten erhöhte RRase-Gehalte erwartet werden. Speziell in Scenedesmus können solche synchronisierten Zellen unter mixotrophen Kulturbedingungen erhalten werden, wenn der Lichtbeginn zur O. Stunde des Zellzyklus als "Zeitgeber" ausbleibt [24].

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ribonucleotidreduktase katalysiert die allosterisch durch Desoxyribonucleosidtriphosphate regulierte Bildung von 2'-Desoxyribonucleotiden aus Ribonucleotiden als Vorbedingung der DNA-Synthese. In durch Hell-Dunkel-Zyklen vollständig synchronisierten, autotroph wachsenden Kulturen der einzelligen Grünalge Scenedesmus obliquus tritt dieses Enzym nur während der S-Phase des Zellzyklus auf. Die Enzymaktivität läßt sich weiter steigern, wenn der Thymidylatstoffwechsel durch 5-Fluordesoxyuridin im Kulturmedium gehemmt wird. Zellen dieser Art dienten als Ausgangsmaterial der in dieser Arbeit beschriebenen Enzymanreicherung.

Der Enzymtest mit tritium-markiertem Cytidindiphosphat als Substrat und Dithiothreit als Reduktionsmittel konnte nach enzymatischem Abbau mit alkalischer Phosphatase durch automatisierte Auftrennung aller Ribo- und Desoxyribonucleoside sowie Nucleobasen unter Anwendung einer Mitteldruck-Chromatographie an Kationenaustauscher und Elution mit einem diskontinuierlichen pH-Borat-Gradienten wesentlich verbessert werden.

Bei konventionellen Enzymreinigungsschritten trat stets eine Inaktivierung des sehr labilen Proteins ein. Erst Affinitätschromatographie an 2',5'-ADP-Sepharose nach einer vorangegangenen Polyethylenimin- und $(NH_4)_2SO_4$-Fraktionierung brachte Erfolg. Andere Affinitätsmaterialien wie "Blue"-Sepharose und dATP-γP-Sepharose sind ebenfalls zur Reinigung des Algenenzyms geeignet, nicht jedoch 5'-AMP-Sepharose.

Affinitätschromatographie führt zur Trennung von zwei nicht identischen, für sich inaktiven Untereinheiten U1 und U2, die sich spontan zum katalytisch aktiven Enzym rekombinieren. Während U1 am Säulenmaterial bindet und mit ATP, oder noch besser mit dATP eluiert werden kann, findet man U2 in der Durchbruchsfraktion. Eine Reinigung des intakten Enzyms war nicht möglich, weil der Zusammenhalt beider Komponenten nur schwach ist. Anschließende Chromatographie an DEAE-Cellulose Butyl-Agarose und Sephadex G-100 erbrachten für U2 eine 175-fach

und für U1 eine 4330-fache Steigerung der spezifischen Aktivität, bei etwa 50 %iger Reinheit von U1.

Während die Untereinheit U1 mit einem Molekulargewicht von 170 000 zwei Polypeptidketten von 90 000 Dalton aufweist, beträgt das Molekulargewicht von U2 76 000. Im Untereinheitenaufbau ähnelt somit die Reduktase aus Scenedesmus den Enzymen aus E. coli, T4-Phagen, Novikoff-Tumor und Knochenmarkzellen. Sie ist Reduktase-Typ I zuzuordnen, da Coenzym B_{12} keinen stimulierenden Einfluß ausübt, N-Hydroxyharnstoff die Aktivität hemmt und das Enzym mit Eisenionen wieder reaktiviert werden kann. Magnesium bleibt jedoch im Gegensatz zu allen anderen Typ I-Reduktasen völlig wirkungslos auf die Enzymaktivität oder den Zusammenhalt beider Untereinheiten. Algen-Reduktase bestätigt ferner die Regel, daß Typ I-Ribonucleotidreduktasen Nucleosiddiphosphate bevorzugen. Das Enzym setzt ADP bei den für CDP optimierten Testbedingungen allerdings nur langsam um. Neben Dithiothreit werden Thioredoxine aus Scenedesmus, aus Hefe (S. cerevisiae), E. coli und der Blaualge Synechococcus als Reduktionsmittel akzeptiert; unklar ist noch, weshalb die homologe Thioredoxinmischung BI-BII die Enzymaktivität geringer als z. B. Hefe-Thioredoxin stimuliert. dATP ist wie in E. coli und einigen tierischen Zellen in geringer Konzentration zunächst ein positiver Effektor, bei höherer Konzentration ($>$ 10 µM) ein starker allosterischer Inhibitor. Nach dem Verhalten bei der Affinitätschromatographie scheinen Nucleotid-Bindungsstellen auf die Untereinheit U1 beschränkt.

Bei Kombination von U1 mit der heterologen E. coli-Reduktase-Untereinheit B2 resultiert eine geringe Enzymaktivität, so daß zumindest eine entfernte enzymologische Verwandtschaft mit dem bakteriellen Enzym vermutet werden darf. Selbst in hochgereinigten Präparationen der Untereinheiten findet man in U1 Nucleosiddiphosphatkinase-Aktivität, in U2 tritt DNA-Polymerase-Aktivität auf. Fraglich ist, ob hier eine auch physiologisch relevante Assoziation dieser im DNA-Stoffwechsel einander funktionell nahestehenden Enzyme vorliegt.

In Scenedesmus-Zellen gelingt eine Steigerung der Ribonucleotidreduktase-Aktivität und Ausbildung großer, teilungsgehemmter Zellen außer durch 5-FdUrd auch mit 5-Fluoruracil, Methotrexat und selbst mit Desoxyuridin. Andere Inhibitoren der DNA-Synthese wie N-Hydroxyharnstoff, Arabinocytidin und Nalidixinsäure sind dagegen in dieser Hinsicht wirkungslos. Der Aktivitätsanstieg ist lichtabhängig und Cycloheximid-sensitiv, aber unempfindlich gegen Lincomycin, einem Inhibitor der chloroplastidären Proteinsynthese. Zusammengenommen legen die Experimente eine kontinuierliche Neusynthese von RRase bei Thymidylatmangel nahe. dTTP oder eine verwandte Verbindung wirkt offenbar wie in tierischen und bakteriellen Zellen als "Repressor" oder "Corepressor" eines noch unbekannten Regulationssystems.

Der intrazelluläre Gehalt der Desoxyribonucleosidtriphosphate während des Zellzyklus steigt von nahezu Null zu Beginn der S-Phase bis auf 4,5 pMol/10^6 Zellen an und korreliert sehr gut mit dem Verlauf der Ribonucleotidreduktase-Aktivität und der DNA-Synthese. Eine Ausnahme macht dGTP, dessen Pool ständig zwischen 5 und 10 pMol/10^6 Zellen liegt und nicht auf Null sinkt. 5-FdUrd führt auch zu einem veränderten Bild der zellzyklusabhängigen dNTP-Poolschwankungen: Hemmung der Thymidylatsynthetase bewirkt Absinken des dTTP-Pools und initiiert nach unbekantem Mechanismus über Neubildung von Ribonucleotidreduktase die verstärkte Synthese von dATP, das allosterisch die Bildung von dCTP und dGTP inhibiert. Die gegenseitige Abhängigkeit von Ribonucleotidreduktion, Thymidylatsynthese und DNA-Replikation und ihre Auswirkung auf das Zellwachstum werden diskutiert.

Literaturverzeichnis

1. H. Follmann, Angew. Chem. 86, 624-634 (1974)
2. P. Reichard, Eur. J. Biochem. 3, 259-266 (1968)
3. B. A. Nordenskjöld, L. Skoog, N. C. Brown, P. Reichard, J. Biol. Chem. 245, 5360-5368 (1970)
4. C. K. Mathews, Exptl. Cell Res. 92, 47-56 (1975)
5. M. K. Turner, R. Abrams, I. Liebermann, J. Biol. Chem. 243, 3725-2738 (1968)
6. S. Hopper, J. Biol. Chem. 247, 3336-3340 (1972)
7. M. L. Elford, Advan. Enzyme Regul. 10, 19-38 (1972)
8. H. P. C. Hogenkamp, G. N. Sando, Struct. Bonding 20, 23-58 (1974)
9. R. R. Schmidt in: Cell Cycle Controls, p. 201-233, Academic Press 1974
10. R. R. Schmidt in: Intracellular Protein Turnover, p. 77-100, Academic Press 1975
11. F. S. Baechtel, H. A. Hopkins, R. R. Schmidt, Biochim. Biophys. Acta 217, 216-219 (1970)
12. D. J. Talley, L. H. White, R. R. Schmidt, J. Biol. Chem. 247, 7927-7933 (1972)
13. O. Th. Schönherr, F. Wanka, Biochim. Biophys. Acta 232, 83-93 (1971)
14. M. Lowdon, E. Vitols, Arch. Biochem. Biophys. 158, 177-184 (1973)
15. W. Feller, Diplomarbeit, Marburg 1975
16. F. K. Gleason, I. M. Wood, Science 192, 1343-1344 (1976)
17. P. Reichard, Fed. Proceedings 37, 9-14 (1978)
18. W. Wagner, Dissertation, Marburg 1978
19. A. Holmgren, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2275-2279 (1976)
20. N. I. Danilova, S. A. Silaeva, S. S. Debov (Übersetzung) Biokhimiya 42, 1973-1977 (1977)
21. H. Elford, H. Freese, E. Passamani, H. P. Morris, J. Biol. Chem. 245, 5228-5233 (1970)
22. H. Elford, Arch. Biochem. Biophys. 163, 537-543 (1974)
23. E. Baril, B. Baril, R. B. Luftig, H. Elford, unveröffentlicht
24. H. Senger, persönl. Mitteilung

25. F. K. Gleason, FEMS Microbiol. Lett. 3, 241-243 (1978)
26. H. Müller, R. Wahl, I. Kuntz, H. Follmann, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1298-1303 (1973)
27. I. R. Cowles, I. G. Guevara, Plant Physiol. 51 (Suppl.), 24 (1973)
28. B. Hovemann, H. Follmann, Anal. Biochem. 79, 119-128 (1977)
29. G. Odmark, Physiol. Plant. 25, 158-163 (1971)
30. F. Wanka, J. Moors, F. N. C. Krijzner, Biochim. Biophys. Acta 269, 153-161 (1972)
31. B. Hovemann, Dissertation, Marburg 1976
32. R. L. Blakley, H. A. Barker, Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 391 (1964)
33. A. Larsson, P. Reichard, Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 7, 303-347 (1967)
34. W. M. Lewis, D. R. McNaughton, H. B. LeJohn, J. A. Wright, Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 128-135 (1976)
35. G. Schimpff, H. Müller, H. Follmann, Biochim. Biophys. Acta 520, 70-81 (1978)
36. E. Vitols, V. A. Bauer, E. C. Stanbrough, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 71-77 (1970)
37. J. G. Cory, F. M. Monley, Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1480-1485 (1970)
38. H. Tamiya, T. Iwamura, K. Shibata, E. Hase, T. Nihei, Biochim. Biophys. Acta 12, 23-40 (1953)
39. H. Senger, Planta 90, 243-266 (1970)
40. F. E. Round in: Biologie der Algen, Georg Thieme Verlag 1975
41. H. Gaffron, Biol. Zentr. 59, 302 (1939)
42. H. Senger, Les Cycles Cellulaires et leurs Blocages, publ. CNRS, 1975
43. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Faw, R. J. Randall, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
44. N. I. Bishop, H. Senger, Methods in Enzymol: XXIII, 53-66, Academic Press 1971
45. M. M. Bradford, Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)
46. B. C. Pal, J. D. Regan, F. D. Hamilton, Anal. Biochem. 67, 625-633 (1975)
47. B. C. Pal, J. Chromatogr. 148, 545-548 (1978)

48. H. Simon in: Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen, Springer Verlag 1974
49. E. T. Bush, Int. J. Appl. Radiat. Isotop. 19, 447-452 (1968)
50. J. R. Steeper, C. D. Steuart, Anal. Biochem. 34, 123-130 (1970)
51. A. W. Schrecker, D. W. Jacobsen, J. Kirchner, Anal. Biochem. 26, 474-477 (1968)
52. H. Senger, V. Mell, Methods in Cell Physiol. Vol. XII, 201-220, Academic Press 1976
53. R. R. Bargess, J. J. Jendrisak, Biochemistry 14, 4634-6445 (1975)
54. T. Lien, G. Knutsen, Anal. Biochem. 74, 560-566 (1976)
55. O. Holm-Hansen, W. H. Sutcliffe, J. Sharp, Limnol. Oceanogr. 13, 507-514 (1968)
56. L. A. Loeb, J. Biol. Chem. 244,
57. U. Lindberg, L. Skoog, Anal. Biochem. 34, 152-160 (1970)
58. H. Müller, Dissertation, Marburg 1977
59. C. C. Richardson, C. L. Schildkraut, H. V. Aposlian, A. Kornberg, J. Biol. Chem. 239, 222-231 (1954)
60. K. Randerath in: Dünnschichtchromatographie, Verlag Chemie 1965
61. C. F. Beck, J. Neuhard, E. Thomasson, J. Bacteriol. 129, 305-316 (1977)
62. U. K. Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970)
63. H. Stegemann, Z. Anal. Chem. 252, 165-169 (1970)
64. H. R. Maurer in: Disc Elektrophoresis, Walter de Gruyter 1971
65. R. G. Martin, B. N. Ames, J. Biol. Chem. 236 (5), 1372-1379 (1961)
66. J. M. Brewer, A. J. Peske, T. E. Spencer in: Experimentelle Methoden in der Biochemie, G. Fischer 1977
67. S. Rei-Chi Shen, R. R. Schmidt, Arch. Biochem. Biophys. 115, 13-20 (1966)
68. E. C. Moore, Methods in Enzymol. XII A, 155-164 (1967)
69. S. Eriksson, Eur. J. Biochem. 56, 289-294 (1965)
70. U. von Döbeln, P. Reichard, J. Biol. Chem. 251, 3616-3622 (1976)

71. H. L. Elford, E. L. Bonner, B. H. Kerr, St. D. Hanna, M. Smulson, Cancer Res. 37, 4389-4394 (1977)
72. C. Biswas, J. Hardy, W. S. Beck, J. Biol. Chem. 240, 3631-3640 (1965)
73. D. S. Wilkinson, J. Cramley, J. Biol. Chem. 252, 1051-1056 (1977)
74. R. A. Lewin in: The Genetics of Algae, Blackwell Scientific 1976
75. E. R. Pfefferkorn, L. C. Pfefferkorn, Exp. Parasitology 42, 44-55 (1977)
76. J. Pfau, K. Werthmüller, H. Senger, Arch. Microbiol. 75, 338-345 (1971)
77. F. Stutzenberger, J. Gen. Microbiol. 81, 501-503 (1974)
78. U. von Döbeln, Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1160-1168 (1976)
79. P. Reichard, Acta Chem. Scand. 12, 2048 (1958)
80. R. P. Singhal, Arch. Biochem. Biophys. 152, 800-810 (1972)
81. W. A. Kratz, J. Meyers, Amer. J. Bot. 42, 282-287 (1955)
82. S. Munnavelli, D. V. Parker, F. D. Hamilton, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4233-4237 (1975)
83. S. Eriksson, M. Akerman, L. Thelander, Biochem. Soc. Trans. 5, 739-741 (1977)
84. R. K. Skopes, Biochem. J. 161, 253-263 (1977)
85. M. Belew, J. Porath, J. Fohlmann, J. Chromatogr. 147, 205-212 (1978)
86. E. C. Moore, Advan. Enzyme Regul. 15, 101-114 (1977)
87. O. Berglund, J. Biol. Chem. 250, 7450-7455 (1975)
88. J. G. Cory, A. E. Fleischer, J. B. Munro, J. Biol. Chem. 253, 2898-2901 (1978)
89. E. C. Moore, unveröffentlicht, 1978
90. K. Mosbach, Advances in Enzymol. 46, 205-278 (1978)
91. A. H. A. Bingham, A. F. Sharmann, T. Atkinson, FEBS-Letters 76, 250-256 (1977)
92. Deutsche Offenlegungsschrift Nr. 2001902, Boehringer Mannheim GmbH
93. M. Pries, Diplomarbeit, Marburg 1976
94. M. Grez, J. Nissing, FEBS-Letters 77, 57-60 (1977)
95. S. Hjerten, J. Rosengren, S. Pahlman, J. Chromatogr. 101, 281-288 (1974)

96. J. Visser, M. Strating, Biochim. Biophys. Acta 384, 69-80 (1975)
97. H. A. Maddy in: Biochemical Analysis of Membranes, John Wiley & Sons 1976
98. S. Eriksson, B.-M. Sjöberg, S. Hahne, O. Karlström, J. Biol. Chem. 252, 6132-6138 (1978)
99. C. L. Atkin, L. Thelander, P. Reichard, J. Biol. Chem. 248, 7664-7472 (1973)
100. S. Hopper, Methods in Enzymol. LI, 237-246 (1978)
101. Y. C. Yeh, I. Tessmann, J. Biol. Chem. 253, 1323-1324 (1978) O. Berglund, B.-M. Sjöberg, J. Biol. Chem. 254, 253-254 (1979)
102. W. Ludwig, Dissertation, Marburg 1978
103. G. L. Klippenstein, J. G. Cory, Biochem. Biophys. Res. Commun. 83, 252-258 (1978)
104. L. Thelander, J. Biol. Chem. 248, 4591-4601 (1973)
105. L. A. Loeb, The Enzymes X, 173-209 (1974)
106. L. K. Miller, R. O. Wells, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2298-2302 (1971)
107. C. S. Chiu, P. K. Tomich, G. R. Greenberg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 757-761 (1976)
108. N. R. Cozarelli, Ann. Rev. Biochem. 46, 641-668 (1977)
109. A. Sugino, C. L. Peebles, K. N. Kreuzer, N. R. Cozarelli, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 4767-4771 (1977)
110. H. Bührmann, Diplomarbeit, Göttingen 1977
111. D. S. Dunlop, W. van Elden, A. Lajtha, Biochem. J. 170, 637-642 (1978)
112. G. Knutsen, T. Lien, L. Skoog, Exptl. Cell Res. 83, 442-445 (1973)
113. S. Premer, Staatsexamensarbeit, Marburg 1975
114. S. Shaltiel, Methods in Enzymol. XXXIV, 126-140 (1974)
115. N. C. Brown, Z. N. Canellakis, B. Lundin, L. Thelander, Eur. J. Biochem. 9, 561-573 (1969)
116. M. K. Turner, R. Abrams, I. Lieberman, J. Biol. Chem. 243, 3725-3728 (1968)
117. D. M. Peterson, E. C. Moore, Biochim. Biophys. Acta 432, 80-91 (1976)
118. R. W. Brockmann, S. Shaddix, W. R. Lester, F. M. Schnabel Cancer Res. 30, 2358-2368 (1970)

119. W. H. Lewis, J. A. Wright, J. Cell. Physiol. 97, 87-98 (1978)
120. A. Holmgren, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2275-2279 (197
121. A. Holmgren, J. Biol. Chem. 253, 7424-7430 (1978)
122. R. J. Ellis, M. R. Hartley, Nature New Biol. 223, 193-196 (1971)
123. K. L. Skoog, K. G. Bjursell, B. A. Njordensköld, Advan. Enzyme Regul. 12, 345-354 (1974)
124. E. Liss, S. Brammer, H. Schmidt, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 682-686 (1973)
125. B. B. Gourlie, A. A. Infante, Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 1206-1214 (1975)
126. S. Murphree, E. Stubblefield, E. C. Moore, Exptl. Cell Res. 58, 118-124 (1969)
127. D. Filpula, J. A. Fuchs, J. Bacteriol. 135, 429-435 (1978)
128. D. Filpula, J. A. Fuchs, J. Bacteriol. 130, 107-113 (1977)
129. H. Engelhardt in: Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, Springer-Verlag 1975
130. R. Thauer, H. Schirrmacher, W. Schymanski, P. Schönheit, Z. Naturforsch. 33c, 495-497 (1978)
131. O. Berglund, F. Eckstein, Eur. J. Biochem. 28, 492-496 (19
132. U. van Döbeln, Biochemistry 16, 4368-4371 (1977)
133. O. Berglund, J. Biol. Chem. 247, 7270-2275 (1972)
134. F. D. Hamilton, J. Biol. Chem. 249, 4428-4434 (1974)
135. D. Panagou, M. D. Orr, J. R. Dunstone, R. L. Blakley, Biochemistry 11, 2378-2388 (1972)
136. R. F. Martin, I. Radford, M. Pardee, Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 9-15 (1977)
137. P. E. Bock, C. Frieden, Trends in Biochem. Sciences 3, 100-103 (1978)
138. A. Larsson, Biochim. Biophys. Acta 324, 447-451 (1973)
139. P. J. Hoffmann, R. L. Blakley, Biochemistry 14, 4804-4812 (1975)
140. R. L. Adams, J. G. Lindsay, J. Biol. Chem. 242, 1314-1317 (1967)
141. W. H. Lewis, J. A. Wright, Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 926-933 (1974)

142. E. C. Moore, Cancer Res. 29, 291-295 (1969)
143. H. L. Elford, Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 129-135 (1968)
144. I. H. Krakoff, N. C. Brown, P. Reichard, Cancer Res. 28, 1559-1565 (1968)
145. J.-C. David, F. Chapeville, Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 579-583 (1976)
146. M. H. N. Tattersall, K. R, Harrap, Cancer Res. 33, 3086-3090 (1973)
147. W. H. Lewis, B. A. Kuzik, J. A. Wright, J. Cell. Physiol. 94, 287-298 (1978)
148. P. Brodelius, K. Mosbach, Anal. Biochem. 72, 629-636 (1976)
149. L. K. Miller, R. O. Wells, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2298-2302 (1971)
150. J. M. Polluk, R. Werner, Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 699-705 (1975)
151. C. A. Ross, W. J. Harris, Biochem. J. 171, 241-249 (1978)
152. F. H. Gaertner, Trends in Biochem. Sciences 3, 63-65 (1978)
153. E. Stellwagen, Acc. Chem. Res. 10, 92-98 (1977)
154. N. C. Brown, P. Reichard, J. Mol. Biol. 46, 25-38 (1969)
155. K. L. Skoog, B. A. Nordenskjold, K. G. Bjursell, Eur. J. Biochem. 33, 428-432 (1973)
156. K. Fink, Biochim. Biophys. Acta 414, 85-89 (1975)
157. B. A. Nexo, Biochim. Biophys. Acta 378, 12-17 (1975)
158. L. Skoog, G. Bjursell, J. Biol. Chem. 249, 6434-6438 (1974)
159. J. Neuhard, E. Thomasson, Eur. J. Biochem. 20, 36-43 (1973)
160. C. E. Meyers, R. C. Young, B. A. Chabner, J. Clin. Invest. 56, 1231-1238 (1975)
161. A. Fridland, Cancer Res. 34, 1883-1888 (1974)
162. R. L. P. Adams, S. Berryman, A. Thomson, Biochim. Biophys. Acta 240, 455-462
163. A. V. Hoffbrand, E. Tripp, Brit. Med. J. 2, 140-142 (1972)
164. C. F. Beck, A. R. Eisenhardt, J. Neuhard, J. Biol. Chem. 250, 609-616 (1975)
165. J. Fuchs, J. Bacteriol. 130, 957-959 (1977)
166. E. Bresnick, U. B. Thompson, J. Biol. Chem. 240, 3967-3974 (1965).
167. W. J. Rutter, R. L. Pictet, P. L. Morris, Ann. Rev. Biochem. 42, 601-646 (1973)

168. P. I. Chello, C. A. McQueen, L. M. DeAngelis, J. R. Berti
Cancer Res. 36, 2442-2449 (1976)
169. D. S. Wilkinson, L. P. Solomonson, J. G. Cory,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154, 368-371 (1977)
170. A. Larsson, Eur. J. Biochem. 35, 346-349 (1973)
171. N. Sicard, F. Bouvier, J. Bacteriol. 132, 779-783 (1977)
172. J. R. Cowles, H. J. Evans, S. A. Russell, J. Bacteriol.
97, 1460-1465 (1969)
173. E. F. Carell, G. H. Goetz, Biochem. J. 156, 473-475 (1976
174. J. N. Mitchison in: The Biology of the Cell Cycle,
Cambridge University Press 1971
175. A. V. Hoffbrand, Nature 248, 602-604 (1974)
176. P. V. Dannenberg, Biochim. Biophys. Acta 473, 73-92 (1977

Lebenslauf

12. 2. 1949	Geboren als Sohn des Reinhold Feller und seiner Ehefrau Johanna, geb. Lutze, in Mittelbuchen, Kreis Hanau
1956	Eintritt in die Volksschule Mittelbuchen
1960	Wechsel zur Hohen Landesschule, Hanau
Juli 1968	Abitur im naturwissenschaftlichen Zweig dieser Schule
Juli 1968 bis Oktober 1969	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
Oktober 1969	Studium der Chemie an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
Februar 1972	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
April 1972	Hochschulwechsel zur Philipps-Universität in Marburg
Oktober 1974	Diplom-Chemiker Hauptprüfung
1975	Anfertigung einer Diplomarbeit am Fachbereich Chemie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Follmann im Fachgebiet Biochemie: "Enzymatische Ribonucleotidreduktion in der Grünalge Scenedesmus obliquus"
Dezember 1975	Abschluß als Diplom-Chemiker
Januar 1976 bis April 1979	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Follmann. Wissenschaftl. Mitarbeiter im SFB 103.
August 1975	Verheiratet mit Maria-Elisabeth Kloss
Oktober 1977	Geburt unserer Tochter Meike

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Follmann für die groβzügige und vielfältige Unterstützung während dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. H. Senger, Fachbereich Biologie, danke ich für die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung und für viele Ratschläge zur Kultivierung und Synchronisation der Algenzellen.

Bei Frau G. Müller bedanke ich mich für die sehr gewissenhafte Betreuung der Algenkulturen.
Frau G. Schimpff-Weiland danke ich für die perfekte Mithilfe bei einigen Experimenten.